

Untersuchungen zu
Struktur und Funktion von
Ribonucleoproteinkomplexen
in Säugerzellkernen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr - Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom - Chemiker
Hans - Erich Wilk
aus Dortmund

Bochum, Oktober 1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546407_0024

Untersuchungen zu
Struktur und Funktion von
Ribonucleoproteinkomplexen
in Säugerzellkernen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr - Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom - Chemiker
Hans - Erich Wilk
aus Dortmund

Bochum, Oktober 1984

Ich habe dich sehr lieb und ich hoffe, du wirst auch mich
sehr lieb haben. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir

höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir

höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir

höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir

höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir

höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir
höre. Ich bin sehr glücklich, wenn ich von dir

Für Rita

Ich danke allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Biochemie, die mir in der einen oder anderen Weise bei der Anfertigung dieser Arbeit behilflich waren.

Besonders hervorheben möchte ich Herrn H. Werr, mit dem ich während der letzten 18 Monate zusammengearbeitet habe, Herrn Dr. H.H. Kiltz, der bei der Anfertigung der Aminosäureanalysen behilflich war, und Herrn K. Grabert, dessen hervorragende photographische Arbeit nicht unerwähnt bleiben darf.

Ich danke ganz herzlich Herrn Dr. R. May (ILL Grenoble) für seine Betreuung bei der Durchführung der Neutronenstreuungsmessungen, Herrn H. Heid (DKFZ Heidelberg) für seine Hilfe bei der Anfertigung der tryptischen Peptidkarten, Herrn Prof. P.F. Agris und Frau Dr. A. Boak (Columbia, Missouri, USA) für die Durchführung der Haemagglutinations - Inhibitionsmessungen, Frau Dr. J. Schlepper - Schäfer (Klinikum Düsseldorf) und Herrn Prof. Dr. H.-G. Keyl (Ruhr - Universität Bochum) für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Messungen, sowie Herrn Dr. B. Appel für die Überlassung einer hochaufgereinigten snRNP - Fraktion.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn P. Gräf, der im Rahmen eines Blockpraktikums bei der Durchführung der UV - Quervernetzungsexperimente behilflich war.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Beyreuther für seine Bereitschaft, für diese Arbeit als Gutachter tätig zu sein.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. K.P. Schäfer für seine intensive Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft bedanken.

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Transcription	1
1.2 hnRNA und Prozessierung	2
1.3 Der Export ins Cytoplasma	6
1.4 Zellssysteme und Ziel der Arbeit	6
2. Materialien	8
2.1 Zellkultur	8
2.2 Radioaktive Substanzen	8
2.3 Enzyme	9
2.4 Sonstige Materialien	9
3. Methodischer Teil	11
3.1 Zellkultur	11
HeLa - S3 Zellen	
Präparation und Kultur von Rinderlymphocyten	
3.2 Isotopenmarkierung	11
(^3H)-Uridin Markierung der RNA	
<i>In vivo</i> ^{32}P -Markierung von HeLa Zellen	
<i>In vitro</i> ^{32}P -Markierung von hnRNP-Proteinen	
Markierung mit ^3H -Natriumacetat	
3.3 Präparation von hnRNP - Komplexen	13
3.4 hnRNP - Präparation bei Lymphocyten	14
3.5 Metrizamid - Gradientenzentrifugation	15
3.6 <i>In vitro</i> Rekonstitution von RNP-Komplexen	15
3.7 Elektrophoretische Techniken	16
Gelelektrophorese von Nucleinsäuren	
Protein - Gelelektrophorese	
Zweidimensionale Gelelektrophorese	
3.8 Elektroelution von Proteinen	17
3.9 Peptid - Kartierung	17
Zweidimensionale Kartierung tryptischer Peptide	
Kartierung nach partieller VB-Protease Verdauung	

3.10 Isolation von RNA	19
Poly A(+) - RNA	
Ribosomale RNAs	
snRNA - Präparation	
3.11 Aminosäureanalyse von hnRNP-Proteinen	20
3.12 UV-Quervernetzung von hnRNP-Proteinen mit Nucleinsäuren	21
3.13 Rekonstitutionen mit 20S-snRNP Fraktionen	22
3.14 Immunologische Techniken	23
Festphasen-RiAs	
Haemagglutinationstest	
3.15 Neutronenkleinwinkelstreuung	24
Probenvorbereitung	
Messung	
3.16 Weitere Techniken	25
3.17 Verwendete Standards	25
 4. Ergebnisse	 27
4.1 hnRNP-Partikel: Isolation und Proteinbestandteile	27
4.2 Charakterisierung der "Core"-Proteine	32
Molekulargewichte und isoelektrische Punkte	
Peptid-Kartierung der "Core"-Proteine	
Modifikationen der "Core"-Proteine	
4.3 Die A-Proteine von Lymphocyten und HeLa-Zellen	43
4.4 Die Proteine der D-Gruppe	43
4.5 Aminosäurezusammensetzung der "Core"-Proteine	46
Der DI: Vergleichende Betrachtungen	
4.6 <i>In vitro</i> - Rekonstitution von 35S-RNP Komplexen	54
Native und rekonstituierte Partikel: Vergleichende Untersuchungen	
Rekonstitution mit verschiedenen Polynucleotiden	
Rekonstitution oligomerer RNP Komplexe	
Rekonstitution mit aufgereinigten RNP-Komplexen	
Rekonstitution mit Lymphocyten RNP-Proteinen	
4.7 RNA - Protein Kontakte im RNP - Partikel	69
4.8 Wechselwirkung von hnRNP-Komplexen mit snRNP- Partikeln	72

4.9	Neutronenkleinwinkelstreuung an RNP-Partikeln	78
	"Kalte" Neutronen: Erzeugung und Monochromatisierung	
	Die Streuung an Makromolekülen	
	Die Detektion	
	Die Auswertung	
	Streudaten von RNP-Partikeln	

5.	Diskussion	93
----	------------	----

6.	Zusammenfassung	112
----	-----------------	-----

7.	Literaturverzeichnis	114
----	----------------------	-----

Lebenslauf

Publikationsliste

II. Abkürzungen

A	Adenosin
A ₂₆₀ , A ₅₄₀	Absorbtion bei 260 bzw. 540 nm
BSA	Rinderserumalbumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
Ci (mCi, Ci)	Curie (entspricht $2.22 \cdot 10^{12}$ dpm)
ConA	Concanavalin A (ein Pflanzenelektin)
cpm	Zählimpulse pro Minute (<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute)
DEAE-...	<u>D</u> iethyl <u>a</u> minoethyl.....
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfallereignisse pro Minute (<u>d</u> ecays <u>p</u> er <u>m</u> inute)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure
g	Erdgravitation ($9,81 \text{ m/sec}^2$)
G	Guanosin
HeLa-S3 Zellen	HeLa-Zellen des Subklons S3
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin- ethansulfonsäure
hnRNA	<u>h</u> eterogene <u>n</u> ucleäre RNA
kd, kdal	Kilodalton (Einheit des relativen Moleku- largewichts)
M _r	relative Molekülmasse
MEM	<u>m</u> inimal <u>e</u> ssential <u>m</u> edium
mRNA	"messenger" RNA
N	Nucleotide
NEPHGE	<u>n</u> on <u>e</u> quilibrium <u>p</u> H <u>g</u> radient <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
NP 40	Nonidet P 40 (<u>n</u> on <u>i</u> onic <u>d</u> etergent P 40)
NTP (ATP,CTP,GTP, UTP,TTP)	Nucleosid-5'-triphosphat
PAA-Gel	Polyacrylamidgel
PBS	phosphatgepufferte, physiologische Koch- salzlösung
pI	isoelektrischer Punkt
poly(A), poly(U)	Polyadenylsäure, Polyuridylsäure
PPO	2,5-Diphenyl-oxazolin
RNAase	Ribonuclease

RNP (hnRNP, snRNP)	<u>R</u> ibonucleoprotein (- Partikel)
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
S	Sedimentationseinheit (<u>S</u> vedberg)
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	<u>s</u> mall <u>n</u> uclear RNA
SV 40	<u>S</u> imian <u>V</u> irus 40 (Tumorzelllinie aus Affen)
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Uridin
UV	Ultraviolett

Der Einbuchstabencode der Aminosäuren hat folgende Zuordnungen:

D	Asp	G	Gly	Y	Tyr
N	Asn	A	Ala	F	Phe
T	Thr	V	Val	W	Trp
S	Ser	C	Cys	K	Lys
E	Glu	M	Met	H	His
Q	Gln	I	Ile	R	Arg
P	Pro	L	Leu		

1. Einleitung

Die Entdeckung, daß in eukaryotischen Zellen die genetische Information durch Sequenzen unterbrochen ist, die nicht in den reifen cytoplasmatischen Genprodukten gefunden werden, machte es notwendig, einen Prozessierungsapparat zu postulieren, der das primäre Transcript - die sogenannte hnRNA (heterogeneous nuclear RNA) - in die reife mRNA überführt. Dieser muß in der Lage sein, die eingeschobenen Sequenzen (Introns) der RNA basengenau zu erkennen und herauszuschneiden und die verbleibenden, die genetische Information tragenden, Elemente (Exons) wieder miteinander zu verbinden. Über die einzelnen Schritte von der Transkription zum Export der reifen RNA ins Cytoplasma soll, soweit bis heute bekannt, im folgenden ein kurzer Überblick gegeben werden.

1.1 Transcription

Anders als in Prokaryoten, in denen eine einzige RNA - Polymerase die gesamte RNA - Synthese katalysiert, existieren in Eukaryoten drei verschiedene RNA - Polymerase Spezies, die verschiedene Arten von Genen transkribieren (1): Die Polymerase I synthetisiert die großen ribosomalen RNAs sowie die 5,8 S RNA in Form eines 45 S rRNA - Vorläufers, der dann zu den reifen 28 S, 18 S und 5,8 S rRNAs prozessiert wird (2, 3); die Polymerase II transkribiert Strukturgene für Proteine und die Gene der sogenannten snRNAs (small nuclear RNA); die Polymerase III katalysiert die Synthese von tRNAs, 5 S rRNA und den scRNA - Spezies K und L (small cytoplasmic RNA) zumeist in Form ihrer Vorläufer (5). Das Grundprinzip ihrer Funktion ist der prokaryotischen RNA - Polymerase sehr ähnlich: Erkennt werden spezifische DNA - Sequenzen; die Polymerase bindet an den Promotor, an dem die Synthese, die in 5'- 3'- Richtung erfolgt, beginnt (6, 7). Erreicht die Polymerase ein Stop - Signal, dissoziiert sie von der DNA und setzt die neu synthetisierte RNA frei. Der Einfluß verschiedener Cofaktoren oder Proteine, wie Repressor- und in Eukaryoten besonders Aktivator-Proteine, ist dabei wahrscheinlich (8).

Die Promotoren der drei Polymerasen sind verschieden und beeinflussen, besonders im Fall der Polymerase II, durch ihre Sequenz die Erkennungseffizienz und damit die Transcriptionsrate der entsprechenden Gene. Diese Kontrolle der Transcription ist ein erster Schritt der Genregulation in Eukaryoten (9).

1.2 hnRNA und Prozessierung

Im Rahmen dieser Arbeit ist besonders das Genprodukt der Polymerase II von Interesse. Das primäre Transcript, die heterogene nucleäre RNA (hnRNA), die noch alle intervenierenden Sequenzen (Introns) enthält, wird einer Reihe von modifizierenden Reaktionen unterworfen, die schließlich zur exportreifen mRNA führen. Abb. 1 zeigt einen schematischen Überblick dieser Vorgänge. Noch während der Transcription wird das 5'-Ende der mRNA durch eine Kappenstruktur ($m^7GpppNmp..$) versiegelt (10, 11). Diese Kappe bleibt über den Prozessierungsvorgang hinaus erhalten und beeinflußt nach dem Export aus dem Kern durch Wechselwirkung mit Initiationsfaktoren der Translation die Bindung der mRNA an das Ribosom (12, 13). Zudem stabilisiert sie die RNA gegen den Angriff von 5'-Exonucleasen (13). Über den zeitlichen Ablauf der weiteren Schritte besteht keine völlige Klarheit.

An der hnRNA wird zum einen durch die Aktion einer Endonuclease bei einer Sequenz $5'..AAUAAA..3'$ ein Schnitt durchgeführt und durch eine poly(A) - Polymerase eine etwa 100 - 200 Nucleotide lange Polyadenylsäuresequenz angeheftet (14, 15). Diese Sequenz wird auf der DNA zugleich als Terminationssignal für die Polymerase II gelesen (14). Zum anderen erfolgt eine Methylierung der RNA, bevorzugt am N-6-Stickstoff des Adenins (m^6A). Eine Zuckermethylierung ($2'-OCH_3$) wie an der rRNA erfolgt nicht (16). Die Auswirkungen dieser Basenmethylierungen sind nicht bekannt. Spekulationen über ihre Funktion sind wenig sinnvoll, da mRNA - Spezies bekannt sind, die unmethyliert sind (z. B. Globin- oder Histon-mRNA) (16, 17).

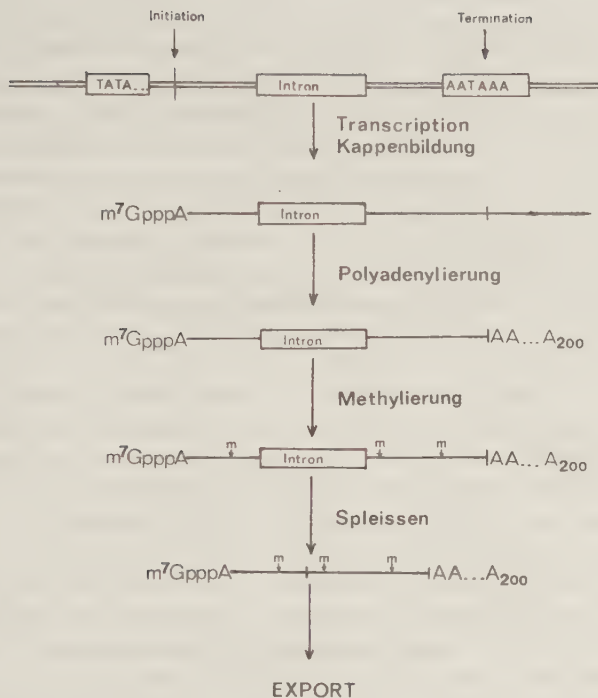


Abb. 1:

Schematische Darstellung der Prozessierungsreaktionen an der hnRNA am Beispiel eines Gens mit einem Intron. Die Folge der Schritte im Schema ist keine Aussage über den zeitlichen Ablauf der Schritte. Das erste Nucleotid der mRNA ist meist ein Purin, hier angedeutet durch 'A'. Bei der Polyadenylierung werden bis zu 200 Adenosinreste angehängt. (Nach Darnell (9), verändert)

Von der poly(A) - Sequenz wird angenommen, daß sie regulatorische Auswirkungen auf den Prozessierungsapparat des Zellkerns hat, indem sie die Existenz einer künftigen mRNA signalisiert (18). Zudem vermittelt sie einen gewissen Schutz vor 3'-Exonucleasen.

Das Herausschneiden der Introns, das sogenannte Spleissen, (englisch: splicing) ist Objekt intensiver Studien gewesen: An die hnRNA binden bereits während ihrer Synthese Proteine, die sich zu Strukturen anordnen, die man

elektronenmikroskopisch als sphärische Partikel mit 15 - 20 nm Durchmesser sichtbar machen kann (19, 20). Isolierte Partikel (hnRNP-Partikel) enthalten eine Gruppe von Proteinen im relativen Molekulmassenbereich von $M_r = 30.000 - 40.000$. Widersprüchliche Daten über die exakte Zahl der beteiligten Proteine wurden publiziert (1 - 40 Proteine) (21, 22, 23, 24, 25); in Säugern werden auf SDS - Polyacrylamidgelen drei eng aufeinander folgende Bandendubletts gefunden. Nach Beyer et al. (25) werden diese sogenannten "Core" - Proteine, die mehr als 60% der Partikelmasse repräsentieren, mit A1/A2, B1/B2 und C1/C2 bezeichnet. Zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennungen besonders von RNP - Proteinen aus Rattenleber (26, 27) und HeLa - Zellen (28) zeigen ein komplexeres Muster von mindestens neun verschiedenen Proteinflecken.

In Anlehnung an die Chromatinstruktur wurde für diese Proteine eine Funktion als Verpackungsproteine für die hnRNA vorgeschlagen. Dieser Hypothese nach wird der eigentliche Spleissvorgang durch lose assoziierte Proteine an der von dem "Core" - Proteinen fixierten RNA durchgeführt (25, 29). Allerdings zeigt die Stöchiometrie einiger "Core" - Proteine eine Abhängigkeit von der Proliferationsrate der Zellen. Speziell das Protein A1 und eventuell C1 nimmt bei aktiv proliferierenden Zellen stark zu (30). Dies und die Tatsache, daß das Protein A1 als einziges "Core" - Protein eine relativ geringe Lebensdauer hat (31), deutet auf eine weitere Funktion zumindest dieses Proteins im Prozessierungssystem hin.

Das basengenaue Herausschneiden der Introns und das Wiederverknüpfen geschieht laut einem Modell von Steitz et al. (32) unter Mitwirkung der oben bereits erwähnten snRNAs. Von diesen sehr stabilen kleinen RNAs (über 30 h Lebensdauer) existieren im Zellkern mindestens sechs verschiedene Spezies, die wegen der hohen Uridinhäufigkeit in ihrer Nucleotidsequenz mit U1 - U6 bezeichnet werden. Sie sind zwischen 80 und 300 Nucleotiden lang und besitzen - mit Ausnahme von U6 - eine Trimethylguanosin ($m^2,2^{\circ}G$) - Kappe (33). Einen zusammenfassenden Überblick über diese RNA - Spezies geben die Artikel von Zieve & Penman (34) und Busch (35). Lerner und Steitz wiesen, bestätigt von anderen Autoren, Basenhomologien zwischen den 5'-Regionen der snRNAs

U1 und U2 und den sehr konservativen Sequenzen der Intron - Exon - Übergänge nach (32, 36, 37). Dies und die Tatsache, daß die snRNAs U1 und U2 mit hnRNP - Partikeln assoziiert sind (38, 39), führte zu folgender Hypothese:

Die snRNAs binden über Basenpaarung im Intron an die ersten fünf bis sechs Nucleotide der Intron Grenzen und fixieren so die hnRNA für den basengenauen Schnitt einer Endonuclease.

Abb. 2 zeigt ein Schema dieser Basenpaarung. Wie sich durch Immunpräzipitation oder Affinitätschromatographie zeigen läßt, liegen die snRNAs dabei mit fünf bis sieben Proteinen assoziiert als sogenannte snRNP - Partikel vor (38, 40).

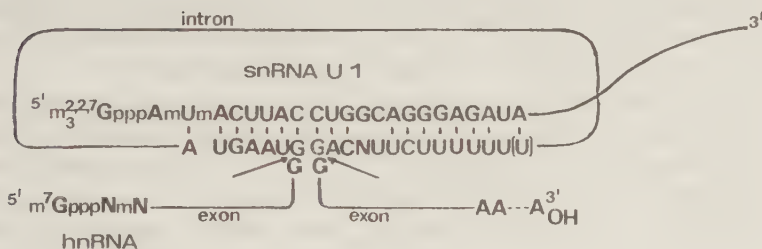


Abb. 2

Schematische Darstellung der Basenpaarung zwischen der snRNA U1 und den Intron Grenzen einer hnRNA. Man beachte, daß diesem Modell zufolge die Exons nach dem Schnitt einer Nuclease nicht mehr fixiert sind. Dies impliziert die Beteiligung einer weiteren Komponente.

Über den exakten Mechanismus der Wechselwirkung der snRNP - Partikel mit der hnRNA und die beteiligten enzymatischen Prozesse besteht Unklarheit, insbesondere da einerseits die Basenpaarung zwischen hnRNA und snRNA allein für eine stabile Bindung der beiden RNP - Partikel nicht ausreicht, und andererseits das Spleiss - Modell von Lerner und Steitz

(32) ohne eine weitere Komponente undenkbar ist, da die Exonenden nach dem Herausschneiden der Introns nicht bis zur Ligation fixiert werden können. Diese Funktion könnte von den Proteinen der snRNP - Partikel übernommen werden.

1.3 Der Export ins Cytoplasma

Nur etwa fünf bis zehn Prozent der transkribierten RNA - Spezies verlassen als reife mRNAs den Zellkern (41). Dieser geringe Wert weist auf einen regulatorischen Schritt beim Export der mRNA hin. Genaue Daten liegen nicht vor, jedoch gibt es Hinweise, daß der Spleissvorgang selbst ein Exportsignal auslöst. So wurde gezeigt, daß ein artifizielles Gen - die cDNA einer 16 S mRNA von SV 40 - zwar transkribiert wird, jedoch nicht als mRNA im Cytoplasma erscheint, während das normale intronhaltige Gen zur reifen 16 S mRNA prozessiert wurde. Die bloße Abwesenheit eines Introns scheint also nicht zum Export zu genügen (42).

Da nicht alle eukaryotischen Gene Introns enthalten, muß diese Regulation durch weitere Mechanismen ergänzt werden. Eine erweiterte Hypothese macht die Komponenten der nucleären Poren, durch die der Transport ins Cytoplasma geschieht, für die Selektion beim Export verantwortlich (43).

1.4 Zellsysteme und Ziel der Arbeit

Diese Arbeit ist Teil eines Projekts zur Untersuchung posttranscriptionaler Prozesse an der hnRNA von Säugerzellen. Das Ziel ist die Untersuchung der hnRNP - Struktur im Zellkern. Dies beinhaltet eine Charakterisierung der RNA - und Proteinkomponenten der Partikel sowie eine Untersuchung ihrer Wechselwirkung miteinander und mit den snRNP - Partikeln, deren Beteiligung am Spleissvorgang postuliert wird.

Durch den Aufbau eines *in vitro* Rekonstitutionssystems soll eine Grundlage für die spätere Entwicklung eines *in vitro* Spleiss - Systems geschaffen werden. Zur Charakterisierung der monomeren hnRNP - Partikel sollen neben den üblichen

biochemischen Methoden auch Neutronenstreuungsmessungen durchgeführt werden.

Das Arbeitsmaterial sind primär HeLa S3 - Zellen, die den Vorteil der einfachen Kultivierbarkeit haben und aufgrund ihres logarithmischen Wachstums hohe Ausbeuten an RNP - Strukturen versprechen. Vergleichende Experimente mit ruhenden und metabolisch aktiven Zellen werden zusätzlich im Concanavalin A stimulierbaren Lymphozytensystem (Lymphozyten aus retropharyngealen Lymphknoten von Rindern - ruhend und mitogen-stimuliert (44, 45)) durchgeführt. Diese Zellen zeigen, besonders ausgeprägt im ruhenden Zustand, ein leicht verändertes Proteinmuster, das auf erhöhte Modifikation der hnRNP - Proteine zurückzuführen ist (46). Außerdem ist, wie oben erwähnt, das Protein A1 in ruhenden Zellen stark reduziert. Dies ermöglicht Untersuchungen über funktionelle Zusammenhänge zwischen der Menge an isolierbaren RNP - Strukturen, Modifikation und Proliferationsrate.

2. Materialien

2.1 Zellkultur

Für die HeLa - Zellkultur wurde MEM - Medium (Jocklik's Modifikation, Gibco) in folgender Modifikation verwendet:

11,3 g MEM Trockenpulver
2,0 g NaHCO₃
0,45 g Glucose
0,476g HEPES, pH 7,4
ad 1 l mit sterilem H₂O

Das Medium wurde unmittelbar vor Gebrauch mit 5% Serum von neugeborenen Kälbern (NCS, Gibco) versetzt.

Die Rinderlymphocyten wurden in RPMI 1640 - Medium kultiviert:

10,4 g RPMI 1640
2,0 g NaHCO₃
4,0 µl β-Mercaptoethanol
2,4 g HEPES, pH 7,4
ad 1 l mit sterilem H₂O

Dem Medium wurde vor Gebrauch 10% hitzeinaktiviertes Serum von neugeborenen Kälbern (Gibco) zugegeben.

Die Medien wurden mit jeweils 10 ml der folgenden Antibiotika - Stammlösung versetzt:

6000 u/ml Penicillin (ca. 4 g/l)
6000 u/ml Streptomycinsulfat (ca. 8 g/l)

2.2 Radioaktive Substanzen

(5,6- ³ H)-Uridin	40-44 Ci/mmol
(³ H-methyl)-Methionin	68-93 Ci/mmol
(³ H)-Essigsäure (Na-Salz)	>500 Ci/mmol

(^{32}P)-Orthophosphorsäure	>1000 mCi/mmol
(γ - ^{32}P)-ATP	1000-3000 Ci/mmol
(α - ^{32}P)-ATP	>300 Ci/mmol
(^{125}J)-NaJ	17 Ci/mmol

Sämtliche radioaktiven Substanzen wurden von Amersham - Buchler oder New England Nuclear (NEN) bezogen. Zur Umrechnung - es gilt: 1 mCi = 37 MBq (Bequerel).

2.3 Enzyme

Proteinase K (E.C. 3.4.21.14)	Merck
RNAase A (E.C. 3.1.27.5)	Boehringer
RNAase T1 (E.C. 3.1.27.3)	Boehringer
Staphylococcus Aureus VB Nuclease (E.C. 3.1.31.1)	Boehringer
Staphylococcus Aureus VB Protease (E.C. 3.4.21.19)	Miles
Trypsin (E.C. 3.4.21.4)	Sigma

2.4 Weitere Materialien

Ampholine (pH 3,5 - 10)	LKB
BSA	Sigma
Conalbumin	Sigma
Concanavalin A	Boehringer
DEAE-Cellulose	Whatman
Harnstoff ("ultra pure")	BRL
Heparinsulfat	Sigma
Metrizamid	Nyegaard
MS 2 RNA	Boehringer
Myoglobin (Von Pferd und Wal)	Serva
Nucleotide (NMP, NTP) als Na-Salze	Boehringer
Natriumdesoxycholat	Sigma
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll
NP 40	Roth
Oligo(dT) Cellulose	PL-Biochemicals

Ovalbumin	Sigma
Phosphoaminosäuren (P-Ser, P-Thr, P-Tyr)	Sigma
Phosphorylase b	Boehringer
Polynucleotide (poly(A), poly(U), poly(AU), poly(A)*poly(U)) als Na-Salze	Boehringer
Ribonucleosid-Vanadyl-Inhibitor	BRL
Saccharose (RNAasefrei)	BRL
SDS	Serva
tRNA (aus Bäckerhefe und E.Coli)	Boehringer
Triton-X-100	Serva
Tween 80	Serva

Alle weiteren Materialien wurden in p.A.- Qualität von den Firmen Baker, Boehringer, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen.

3. Methodischer Teil

3.1 Zellkultur

3.1.1 HeLa - S3 Zellen

HeLa - S3 Zellen wurden in MEM - Medium (Jocklik's Modifikation - Gibco) mit 5% Serum von neugeborenen Kalbern (NCS) als Rührkultur gehalten. Die Zellen wurden durch tägliches Verdünnen (1:1) des Medium in logarithmischem Wachstum gehalten. Die Zelldichte lag zwischen $2,5$ und 6×10^5 Zellen/ml.

3.1.2 Präparation und Kultur von Rinderlymphocyten

Rinderlymphocyten aus retropharyngealen Lymphknoten wurden nach einer Vorschrift von Peters (47) mit einigen Modifikationen präpariert. Kontaminierende Erythrocyten wurden nach Lyse mit Wasser durch Filtration abgetrennt. Die Zellen wurden bei $480 \times g$, 10 min, $4^\circ C$ zentrifugiert und in einer Dichte von 5 bis 6×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 - Medium mit 10% NCS aufgenommen. Die Kultur wurde in Fernbach - Zellkulturkolben (ca. 500 ml/Kolben) bei $37^\circ C$ und 7,5% CO_2 in einem Brutschrank bei 100% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die mitogene Stimulation der Rinderlymphocyten erfolgte sofort nach der Präparation (8 h nach dem Tod der Donortiere) mit $7,5 \mu g/ml$ Concanavalin A (ConA).

3.2 Isotopenmarkierung

3.2.1 (3H)-Uridin Markierung der RNA

Zur Isotopenmarkierung der hnRNA wurden die Zellen auf 5×10^7 Zellen/ml konzentriert (Lymphocyten: 5×10^6 Z/ml) und mit $50 \mu Ci/ml$ (3H) - Uridin für 15 min inkubiert. Langzeitmarkierungen für snRNA oder rRNA wurden bei normaler Zelldichte mit $0,2 \mu Ci/ml$ Zellkultur (3H) - Uridin durchgeführt (10-18 h).

3.2.2 In vivo ^{32}P - Markierung von HeLa Zellen

Die Zellen wurden abzentrifugiert (450xg) und in fünffacher Dichte in phosphatfreiem Medium ohne Serum resuspendiert (Zelldichte: ca. 2×10^6 Z/ml). Die Markierung erfolgte mit $10 \mu\text{Ci/ml}$ Zellkultur (^{32}P) - Orthophosphorsäure für 4 Stunden.

3.2.3 In vitro ^{32}P - Markierung von hnRNP - Proteinen

Kinase - Puffer: 100 mM NaCl
10 mM MgCl_2
1 mM Dithiothreitol (DTT)
70 mM Tris/HCl, pH 7,6

Proben mit etwa 0,1 mg Protein (Kernextrakt oder hnRNP - Fraktionen aus Sucrosegradienten) wurden in Kinase - Puffer mit 10 - 20 μCi (γ - ^{32}P) - ATP für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Fällung mit Ethanol (3 Vol.) gestoppt.

3.2.4 Markierung der Proteine mit (^3H -methyl) - Methionin

Die Zellen wurden bei normaler Zelldichte für 20 - 24 h mit $0,3 \mu\text{Ci/ml}$ (^3H -methyl) - Methionin markiert. Waren für einzelne Experimente besonders hohe Einbauraten notwendig, wurden die Zellen abzentrifugiert (450xg) und in fünffacher Zelldichte in methioninfreiem Medium ohne Serum resuspendiert. Die Markierung erfolgte mit $2 \mu\text{Ci/ml}$ Zellkultur (^3H -methyl) - Methionin für 4 Stunden.

3.2.5 Markierung mit (^3H) - Na - Acetat

Zur spezifischen Markierung von acetylierten Proteinen wurden die Zellen bei einer Dichte von 5×10^7 Zellen/ml in serumfreiem Medium mit $250 \mu\text{Ci/ml}$ Zellkultur (^3H) - Acetat für 10 min bei 37°C inkubiert.

3.3 Präparation von hnRNP - Komplexen

PBS: 150 mM NaCl
 10 mM Na₂HPO₄
 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Lysis-Puffer: 10 mM NaCl
 1,5 mM MgCl₂
 10 mM Tris/HCl, pH 7,0

STM - A: 100 mM NaCl
 1,5 mM MgCl₂
 10 mM Tris/HCl, pH 7,0

STM - B: 100 mM NaCl
 1,5 mM MgCl₂
 10 mM Tris/HCL,pH 8,0

Wenn nicht besonders erläutert, wurden alle Schritte in der Kälte durchgeführt (4°C).

Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 450xg, RT) und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach Resuspension in Lysis - Puffer (Zellkonzentration ca. $1-3 \times 10^7$ Z/ml) wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) mit dem nichtionischen Detergenz NP-40 versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch acht Stöße eines engsitzenden Pistills in einem Homogenisator nach Potter aufgebrochen. Die Kerne wurden pelletiert (600xg, 0°C, 10 min) und jeweils einmal mit Lysis - Puffer, STM - A und STM - B gewaschen. Die so gewonnenen Kerne erschienen im Phasenkontrastmikroskop cytoplasmafrei.

Die Kerne wurden bei einer Dichte von $3-5 \times 10^9$ K/ml in STM - B aufgenommen und dreimal 25 min bei Raumtemperatur durch langsames Rühren extrahiert.

Die vereinigten Extrakte wurden durch Zentrifugation (16.300xg, 10 min, 0°C) von Schwebeteilchen und hochmolekularen Aggregaten befreit. Jeweils 1-1,5 ml nucleärer Extrakt (maximal 10 A₂₆₀ - Einheiten) wurden auf 15 - 30 %igen Sucrosegradienten in STM - A Puffer aufgetrennt (SW 40-Rotor, 26.000 rpm = 88.000xg, 2°C, 16 h). Es wurden Fraktionen von 1 ml (oder 0,8 ml) gesammelt. Die

Absorption bei 260 nm wurde mittels einer Durchflußküvette ($d=0,25$ cm) in einem Gilford - Spektralphotometer gemessen. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen ((^3H) -Uridin oder $(^3\text{H}$ -methyl) - Methionin) wurde durch TCA - Fällungen von Aliquots bestimmt. Die Fällungen wurden über Glasfaserfilter abgesaugt und die Radioaktivität auf den Filtern in einem PPO/Toluol - Mix in einem Beckman Szintillationszähler bestimmt.

Zur weiteren Aufreinigung wurden die RNP - haltigen Sucrosegradientenfraktionen durch Zentrifugation bei $100.000 \times g$ (16 h, 0°C) sedimentiert. Das Sediment wurde durch vorsichtiges Schütteln während einiger Stunden in STM - A Puffer mit 15 % Sucrose in Konzentrationen von 1 - 3 mg/ml resuspendiert.

3.4 hnRNP - Präparation bei Lymphocyten

Lysis - Puffer: 10 mM NaCl
3 mM CaCl_2
1,5 mM MgCl_2
10 mM Tris/HCl, pH 7,0

"Magic"- Lösung: 2 Teile 10%ige Tween 80 Lösung (v/v)
1 Teil 10%ige Na-desoxycholat Lösung
(w/v) in H_2O

Die Lyse der Lymphocyten erfolgte analog 3.3 mit dem modifizierten Lysis - Puffer (+ 3mM CaCl_2). Zur Reinigung der Kerne wurde ein Waschschriff mit dem Doppeldetergenz "Magic" durchgeführt (48). Dazu wurden die grob gereinigten Kerne in Lysis -Puffer auf 1 % "Magic" (v/v) gebracht und durch vier Stöße eines lose sitzenden Pistills von anhaftendem Cytoplasma befreit. Danach wurde sofort um einen Faktor 3 ausverdünnt und abzentrifugiert (0°C , 10 min, $600 \times g$).

Die weitere Aufarbeitung verlief völlig analog zu Kapitel 3.3. Es wurde jedoch nur zweimal bei Raumtemperatur extrahiert.

3.5 Metrizamid - Gradientenzentrifugation

Nucleäre Extrakte, 40 S Regionen von Sucrosegradienten oder andere RNP - enthaltende Fraktionen wurden über einen Metrizamid - Stufengradienten geschichtet (40 und 60 % Metrizamid in STM-A, bzw. 25 und 40 % Metrizamid in STM-A in D_2O und 60 h bei $130.000 \times g$ (SW -41 Rotor, Beckman) bei $5^\circ C$ zentrifugiert. Die Gradienten wurden in 0,3 ml Fraktionen gesammelt. Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde über ihren Brechungsindex nach folgenden Formeln bestimmt:

$$\begin{aligned} \rho_{5^\circ C}^{H_2O} &= 3,453 \cdot \eta^{20^\circ} - 3,601 \\ \rho_{5^\circ C}^{D_2O} &= 3,0917 \cdot \eta^{20^\circ} - 2,9984 \end{aligned}$$

3.6 In vitro Rekonstitution von RNP - Komplexen

Nucleäre Extrakte, RNP - enthaltende Gradientenfraktionen oder pelletierte, resuspendierte RNP - Partikel (jeweils 0,2 bis 1 mg Protein) wurden in Gegenwart von 1 mM $CaCl_2$ für 30 min bei $37^\circ C$ mit 150 u/ml Staphylococcus Nuclease zur Verdauung der endogenen Nukleinsäuren inkubiert. Die Verdauung wurde durch Zugabe von EGTA bis zur Endkonzentration von 10 mM gestoppt. Exogene RNAs wurden im Verhältnis 8 : 1 (Protein : RNA) bei nucleären Extrakten und im Verhältnis 4 : 1 im Falle von pelletierten Partikeln und Gradientenfraktionen hinzugegeben. Zur Rekonstitution wurde 1 h bei $25^\circ C$ unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Rekonstitutionsansätze wurden durch Zentrifugation (10 min, $0^\circ C$, $3.000 \times g$) von Schwebeteilchen und Trübungen befreit und wie beschrieben auf 15 - 30 %igen Sucrosegradienten analysiert.

In einigen Experimenten wurden RNP - enthaltende Fraktionen zur Dissoziation der partikulären Struktur auf 4M Harnstoff gebracht und ohne Verdauung oder nach Staphylococcus - Nuclease - Verdauung mit exogener RNA versetzt. Die Rekonstitution erfolgte durch Dialyse des Ansatzes gegen STM-A Puffer (dreimal 1 h, $4^\circ C$).

Rekonstitution oligomerer RNP - Strukturen

Zur Reduktion nucleolytischer Restaktivitäten der Staphylococcus - Nuclease wurde die Nucleasemenge auf 5 - 15 u/ml reduziert oder in Abwesenheit von Nuclease rekonstituiert. Inhibitionsversuche der endogenen Nucleasen wurden durch Rekonstitutionsansätze mit folgenden Inhibitoren durchgeführt: Heparinsulfat (50 µg/ml), Vanadyl - Inhibitor (1 - 10 mM (59)), RNAasin, ZnCl_2 , CoCl_2 , CdCl_2 (jeweils 0,1 bis 1 mM) und 3',5' - Thymidindiphosphat (pTp) sowie 5'-AMP.

3.7 Elektrophoretische Techniken

3.7.1 Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

DNA und RNA wurden auf 1%igen Agarose Gelen in TEB - Puffer aufgetrennt (1-3 h, 150 V) oder auf 4 - 17 %igen SDS - PAA - Gradientengelen analysiert.

Kleine RNAs wurden auf 10 %igen PAA - Gelen (Acrylamid : Bisacrylamid = 30 : 1,5) in einem Tris/Glycin - Puffersystem aufgetrennt (49).

3.7.2 Protein - Gelelektrophorese

Proteine wurden auf Polyacrylamid Gelen nach Laemmli (50) analysiert.

Für einige Trennprobleme wurden die Gele in Gegenwart von 4M oder 8M Harnstoff elektrophoriert. Alle anderen Parameter blieben unverändert.

3.7.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Proteine wurden in der ersten Dimension als Röhrchengel (11 cm lang, 3 mm Durchmesser) unter NEPHGE - Bedingungen nach O'Farrell (1600 Vh) (51) elektrophoretisch getrennt. Die zweite Dimension war ein Polyacrylamidgel nach Laemmli (s. 3.7.2).

3.8 Elektroelution von Proteinen

Puffer I: 0,5 M NH_4HCO_3
1 % SDS

Puffer II: 50 mM NH_4HCO_3
0,1 % SDS

Ein- oder zweidimensional aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie Blau R angefärbt. Die jeweiligen Banden oder Flecken wurden ausgeschnitten und in Puffer I äquilibriert. Die äquilibrierten Gelstücke wurden in einen Schenkel einer H - förmigen Elutionsbrücke gegeben und mit Puffer II überschichtet. Die Elektroelution erfolgte in einer Apparatur nach Hood et al.(52) bei 50 V in Puffer II in Gegenwart von 5 % β -Mercaptoethanol. Der Puffer wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe kontinuierlich umgewälzt.

Die durch mitelierten Farbstoff blaugefärbte Bande wurde nach etwa 18 h aus dem zweiten Schenkel entfernt und eingefroren.

Die exakten Abmessungen der Elutionsapparatur sind beschrieben bei Hood et al.(52).

3.9 Peptid - Kartierungen

3.9.1 Zweidimensionale Kartierung von tryptischen Peptiden

Coomassie - Blau - gefärbte Proteinflecken wurden aus zweidimensionalen NEPHGE - Gelen ausgeschnitten, wiederholt mit 10 %igem Methanol in Wasser gewaschen und lyophilisiert. Die Gelstückchen wurden nach der Chloramin T - Methode von Greenwood (54) jodiert. Im einzelnen: In silikonisierten Plastikröhrchen (3,5 ml) wurden die getrockneten Gelstücke zu einem Gemisch von 5 μl 0,1 %iger Chloramin T - Lösung in Wasser, 3 μl Na^{125}I (= 0,3 mCi) und 22 μl 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 gegeben. Die Ansätze wurden 30 min bei 25°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 0,1 %iger NaHSO_3 - Lösung (w/v) wurde die Reaktion gestoppt.

Überschüssiges Jod wurde durch wiederholtes Waschen mit 10 % Methanol entfernt. Die Gelstückchen wurden wiederum lyophilisiert und in 1 ml Trypsinpuffer (50 mM NH_4HCO_3) aufgenommen. Die Verdauung erfolgte mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin für 24 h bei 37°C. Während dieser Zeit diffundierten die tryptischen Fragmente aus dem Gel. Die überstehende Lösung wurde innerhalb von 24 - 36 h lyophilisiert.

Die zweidimensionale Auftrennung erfolgte auf 10 x 10 cm Cellulose Dünnschichtplatten. Für die erste Dimension wurde das Lyophilisat in 30 μl Elektrophoresepuffer aufgenommen ($\text{CH}_3\text{COOH} : \text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} = 15 : 5 : 80$, pH 1,9). Aliquots von 60.000 bis 250.000 cpm wurden auf die Platten aufgetragen und der Lauf bei 1.000 V etwa 25 min in Richtung Kathode durchgeführt, bis ein mitlaufender TLC - Farbmaler 60 % der Laufstrecke zurückgelegt hatte.

Die sorgfältig getrockneten Platten wurden in der zweiten Dimension in Chromatographiepuffer (n-Butanol : Pyridin : Essigsäure : $\text{H}_2\text{O} = 130 : 100 : 20 : 80$) etwa 1,5 h aufsteigend chromatographiert, bis die Flüssigkeitsfront die obere Kante der Platte erreichte.

Die Platten wurden nach dem Trocknen auf Kodak - XAR Filmen autoradiographiert.

Diese Experimente, die einer Vorschrift von Elder et al. (53) entsprachen, wurden im Labor von Herrn Dr. Jarasch am DKFZ, Heidelberg unter Anleitung von Herrn Hans Heid durchgeführt.

3.9.2 Peptidkartierung nach partieller V8-Protease Verdauung

V8 - Protease Puffer: 1 mM EDTA
0,2 % SDS
5 % β -Mercaptoethanol
20 % Glycerin
125 mM Tris/HCL, pH 6,8

Coomassie - Blau - gefärbte Proteinflecken wurden aus 2D - Gelen ausgeschnitten, in V8 - Protease Puffer äquilibriert (ca. 1 h) und in die Taschen eines 18 %igen Polyacrylamidgels gegeben. Es wurden verschiedene Mengen Staphylococcus Aureus V8 Protease (5 - 500 ng/Spur)

hinzugegeben und elektrophoriert. Nach erfolgter Fokussierung der blauen Farbstoffe (Bromphenolblau, Coomassie) im Sammelgel wurde die Elektrophorese für 30 min gestoppt. Während dieser Zeit erfolgte die partielle Proteasespaltung.

Danach wurde der Lauf fortgesetzt, bis die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gels erreichte.

Diese Vorschrift ist eine Modifikation der von Cleveland et al. (55) publizierten Methode.

3.10 Isolation von RNA

3.10.1 Poly A(+) - RNA

SDS - Puffer: 50 mM NaCl
 5 mM EDTA
 3 % SDS
 20 mM Tris/HCl, pH 7,4

Oligo - dT Bindungspuffer: 400 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0,1 % SDS
 10 mM Tris/HCl, pH 7,0

Der Überstand der Zellyse mit NP-40 (siehe 3.4) wurde zur Entfernung von Lysosomen und Mitochondrien jeweils 10 min bei 3.000 x g bzw. 16.000 x g (0°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 150 mM NaCl, 0,5 % SDS gebracht und 2 h bei 37°C mit 0,1 mg/ml Proteinase K verdaut (56).

Nach Ethanolpräzipitation (3 Vol. Ethanol, 30 min, -70°C) und Zentrifugation (10 min, 16.000 x g, 0°C) wurde das Präzipitat in SDS - Puffer aufgenommen und phenolisiert.

Die wässrige Phase wurde wiederum ethanolgefällt und zentrifugiert (s.o.). Das Sediment wurde in Oligo(dT) - Bindungspuffer aufgenommen und über Oligo(dT) - Cellulose aufgetrennt (57).

3.10.2 Ribosomale RNAs

Der Durchlauf der Oligo(dT) - Cellulose Säule wurde ethanolgefällt, in SDS - Puffer aufgenommen und auf 15 - 30 %igen Sucrosegradienten in SDS - Puffer aufgetrennt. Die Zentrifugation erfolgte bei 25°C für 17 h bei 89.000 x g. Der Gradient wurde in 0,5 ml Portionen fraktioniert. Fraktionen die dem 28 S, 18 S bzw. 5 S Bereich entsprachen, wurden vereinigt und ethanolgefällt.

3.10.3 snRNA - Präparation

Jeweils 10^8 ganze Zellen oder 3×10^8 Zellkerne wurden unter kräftigem Schütteln in SDS - Puffer lysiert und mit 0,25 mg/ml Proteinase K 2 h bei 37°C verdaut.

Das verdaute Lysat wurde mit 2 Volumen warmem Ethanol verstimt. Die fädig ausfallende DNA wurde mit einem Glasstab entfernt, und in etwas absolutem Alkohol durch kräftiges Schütteln gewaschen. Die beiden Ethanollösungen wurden vereinigt und zur Präzipitation niedermolekularer RNA 30 min bei -70°C inkubiert und abzentrifugiert (s. vorne).

Die so gewonnene 5 S RNA, tRNA und snRNAs wurden als Elektrophoresemarkers eingesetzt.

3.11 Aminosäureanalyse von hnRNP - Proteinen

Elektroeluierte Einzelproteine oder 40 S - Fraktionen von Sucrosegradienten wurden ethanolgefällt. Bei geringen Proteinkonzentrationen wurde mit 3 µg MS 2 Phagen RNA als "Carrier" gearbeitet.

Die Proteinpräzipitate wurden in 6 N HCl bei 110°C für 24, 48 oder 72 h im Vakuum hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse wurde auf einem BC 200 - Aminosäureanalysator (LKB) in einem Lithiumcitrat - Puffersystem durchgeführt (58).

Zur Bestimmung von Methionin und Cystein wurde vor der Hydrolyse in HCl 2 h mit H₂O₂ / Ameisensäure (5:95) im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Proben wurden durch wiederholtes Lyophilisieren peroxidfrei gemacht und wie oben

hydrolysiert und analysiert.

Die Tryptophananalyse erfolgte durch Hydrolyse mit 50 µl Mercaptoethansulfonsäure für 24 h bei 110°C im Vakuum. Die Analyse wurde nach Neutralisation der Sulfonsäure mit 3 M LiOH wie üblich durchgeführt.

Zur Identifikation methylierter Aminosäuren wurden Hydrolysate von (³H - methyl) - Methionin markierten Proteinen analysiert. Das Eluat wurde in 1 oder 2 ml Fraktionen gesammelt und mit 5 ml Quickszint KL-372 (Zinsser) ausgezählt.

Standardisiert wurde mit einem Aminosäurestandard (Beckman) unter Zusatz von N^α-Monomethyl-L-Arginin, N^α,N^α-Dimethyl-L-Arginin und N^α,N^ω-Dimethyl-L-Arginin (Calbiochem).

Die Analyse auf Phosphoaminosäuren erfolgte durch 2-stündige Hydrolyse der ³²P - markierten Proteine bei 110°C mit 6 N HCl. Die Elution erfolgte in einem modifizierten Li - Citrat Puffer bei pH 1,05. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde wie oben bestimmt. Zur Standardisierung wurden unmarkierte Phosphoaminosäuren (P-Tyr, P-Ser, P-Thr) zusammen mit der Probe chromatographiert.

3.12 UV-Quervernetzung von hnRNP - Proteinen mit Nucleinsäuren

HEPES - Puffer: 100 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
10 mM HEPES/NaOH, pH 7,0

Eingesetzt wurden hnRNP - Proben, die entweder in vivo mit radioaktivem Uridin kurzzeitmarkiert waren (15 min, s. Kapitel 3.2) oder Proben, die mit radioaktiv markierter RNA rekonstituiert worden waren.

Alle Proben wurden zur Bestrahlung gegen einen HEPES - Puffer dialysiert, um Nebenreaktionen des üblichen Tris - Puffers auszuschließen.

Die Ansätze wurden in einer 1,5 ml Quarzküvette für 15 bis 540 sec mit einer Quecksilberdampfampe mit einer Ausgangsenergie von 500 W bestrahlt. Der ausgestrahlte Wellenlängenbereich war größer als 250 nm, wie durch Messung des Lampenspektrums festgestellt wurde.

Zur Feststellung der Menge an kovalent gebundener Nucleinsäure wurden Aliquots mit 20 µg/ml RNAase A und 10 µg/ml RNAase T1 verdaut. Nach 1,5 h wurde der Ansatz auf 4M Harnstoff gebracht, um eventuelle Verklumpungen zu lösen. Es wurde dann weitere 60 min verdaut.

Die Radioaktivität wurde nach TCA - Fällung und Filtration über Glasfaserfilter in 4 % PPD in Toluol mittels eines Beckman - Szintillationszählers bestimmt.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proben ethanolgefällt, in Laemmli - Probenpuffer aufgenommen und auf 10 %igen PAA - Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blau (Serva Blau R) angefärbt.

Zur Bestimmung der kovalent mit RNA verbundenen Proteine wurden die gefärbten Gele der Fluorographie nach Laskey und Mills unterzogen(60).

3.13 Rekonstitutionen mit 20S-snRNP Fraktionen

Es wurden angereicherte (³H)-Uridin markierte snRNP - haltige Fraktionen aus 15 - 30 %igen Sucrosegradienten (s.3.3) oder aufgereinigte ³²P - markierte snRNP - Partikel (zur Verfügung gestellt von Dr. B. Appel (MPI für Molekulare Genetik, Berlin)) eingesetzt.

Bei Bindungsexperimenten an MS 2 - RNA oder native hnRNP - Partikel wurden 50 µg MS 2 - RNA bzw. 1 mg nucleärer Extrakt für 30 min bei 20°C und weitere 60 min bei 0°C mit snRNP - Fraktionen, die 50.000 bis 100.000 cpm an inkorporierter Radioaktivität enthielten, inkubiert. Die Radioaktivität war in den angereicherten snRNP - Fraktionen lt. Gelelektrophorese und Fluorographie (s.3.7 und 3.16) zu 10 - 30 % in snRNAs inkorporiert.

Die Ansätze wurden auf 15 - 30 %igen Sucrosegradienten wie in 3.4 beschrieben analysiert. Aus Aliquots wurde die säurefällbare Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt. Jeweils zwei Fraktionen wurden vereinigt und der Gelelektrophorese für kleine RNA - Spezies unterzogen (s. 3.7). Die radioaktiven Banden wurden durch Fluorographie sichtbar gemacht.

Bei Bindungsexperimenten an rekonstituierte RNP - Komplexe wurde der Rekonstitutionsansatz (entspricht 3.6) für 5 min

bei 200 x g, 0°C zentrifugiert, um Trübungen und hochmolekulare Aggregate zu entfernen. Danach wurde verfahren wie oben beschrieben.

Wegen der Empfindlichkeit der Wechselwirkung von snRNP - und hnRNP - Partikeln wurde bei den Experimenten darauf geachtet, daß die NaCl - Konzentration 100 mM nicht überschritt. Einige Experimente wurden in Gegenwart von Polyuridyl- bzw. Polyadenylsäure (10 facher Überschuß bezogen auf die A_{260} -Werte) oder in einer NaCl - Konzentration von 200 mM durchgeführt.

3.14 Immunologische Techniken

Festphasen - RIAs

PVC - Microtiterplatten wurden mit jeweils 10 - 15 µg Protein aus Gradientenfraktionen beschichtet (nach Bradford (61)). Nach 12 h bei 4°C wurde zweimal für 10 min mit PBS + 3% BSA gewaschen und für 3 - 8 h mit anti U1-RNP Antikörpern (aus Serum von MCTD - Patienten; zur Verfügung gestellt von Prof. Paul F. Agnis, Columbia, Missouri) inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen (s.o.) wurde mit (125 J) - Protein A für 3 h bei 0°C inkubiert. Die durch Waschen nicht entfernbare Radioaktivität wurde in einem Zinsser- γ -Zähler ausgezählt. Als Referenz wurden Proben ohne Antigen bzw. ohne Antikörper mitgemessen.

Haemagglutinationstest (108)

Dieser Test wurde von Dr. A. Boak (Columbia, Missouri) durchgeführt. In Kürze: Erythrocyten von Schafen werden mit Antigen beladen (sensitiviert). Bei Inkubation mit spezifischen Antiseren wird eine Haemagglutination bewirkt. Werden die Antiseren mit antigen - enthaltenden Proben vorinkubiert, wird die Agglutination inhibiert. In der Praxis testet man Verdünnungsreihen (2^N) um die Antigenmenge zu bestimmen.

3.15 Neutronenkleinwinkelstreuung

3.15.1 Probenvorbereitung

Native und rekonstituierte 35 - 40 S RNP - Komplexe aus Sucrosegradienten wurden, wie beschrieben, pelletiert (s.3.3) und in STM - A Puffer + 15% Sucrose in H₂O oder D₂O aufgenommen. Bei -20°C sind die Partikel in diesen Puffern über Monate stabil. 4 h vor der Messung wurden verschiedene Mischungen der Lösungen hergestellt (0, 15, 85 und 99 % D₂O). Wegen der vorhandenen Sucrose müssen diese Werte durch Transmissionsmessungen mit Neutronen und Vergleich mit Lösungen bekannter D₂O - Gehalte korrigiert werden. Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (61) bestimmt und durch Aminosäureanalyse überprüft.

3.15.2 Messung

Das Prinzip der Messung ist in Kapitel 4.9 beschrieben. Die Messungen wurden bei 5 - 6°C durchgeführt. Etwa 0,3 ml Probe wurden jeweils in Suprasil - Quarz Küvetten mit 1 mm Schichtdicke gemessen. Als Hintergrundwert wurde wegen ihres hohen Absorptionsquerschnitts eine Cd - Probe verwendet, als Nullwerte dienten Pufferlösungen der entsprechenden D₂O - Gehalte, sowie reines H₂O und D₂O. Im Neutronenstrahl wurde hinter der Probe eine Cd - Blende zentriert um die Detektorelektronik nicht zu überlasten. Aufgrund der sehr geringen Probenkonzentrationen (0,5 - 2 mg/ml) wurden jeweils mehrere Langzeitmessungen durchgeführt (jeweils 10⁴ - 3·10⁴ Neutronen auf dem Detektor = etwa 1.000 - 3.000 sec). Zur Messung der Transmissionen wurde jeweils 300 sec lang gemessen.

Die Detektorposition wurde nach mehreren Messungen bei 2,59; 5,59; und 10,59 m Entfernung von der Probe auf 2,59 bzw. 5,59 m festgelegt.

Die Messungen wurden am Institut Laue - Langevin, Grenoble in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R. May durchgeführt.

3.16 Weitere Techniken

Northern - Blot Analyse

Die Durchführung erfolgte völlig analog der in der Literatur beschriebenen Methode (62). Als Gelsystem wurde ein Formaldehyd - Agarose Gel verwendet (62).

Proteinbestimmungen

Proteinkonzentrationen wurden nach der von Bradford beschriebenen Coomassie - Brilliant Blau G - Methode mit BSA als Referenz durchgeführt (61). Die Werte wurden durch Aminosäureanalyse überprüft.

DEAE-Cellulose Chromatographie

Der Probenauftrag erfolgte in 10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 6M Harnstoff. Es wurde, nachdem der Durchlauf aufgefangen war, eine Stufenelution mit 100 mM bzw. 1 M NaCl durchgeführt. Der Durchlauf enthielt die basischen Proteine bis $pI=8,0$, der 100 mM Wasch die neutralen bis etwa $pI=6$ und der 1 M Wasch die sauren Proteine. Zur Orientierung siehe Abb. 4.

3.16 Verwendete Standards

Proteingele

Als Referenzen dienten folgende Proteine:

RNA - Polymerase aus E.Coli:	8	165.000
	B'	155.000
	δ	90.000
	α	39.000
Phosphorylase a (Kaninchen):		92.000
Conalbumin (Eiweiß)		86.000
BSA (Rind)		68.000
Ovalbumin (Eiweiß)		45.000
Aktin (Kaninchen, Rind)		44.000
Chymotrypsinogen (Sojabohnen)		26.000

Myoglobin (Wal, Pferd)	17.000
Lysozym (Eiweiß)	14.000
Cytochrom C (Pferd)	12.000
BrCN - Fragmente des Myoglobin	10.700
	6.200
	2.500

RNA - Polymerase und BrCN - Fragmente des Myoglobin wurden von Herrn Dr. Kiltz zur Verfügung gestellt. Alle anderen Proteine wurden von den Firmen Boehringer, Merck, Serva oder Sigma bezogen.

RNA - Gele

Für Agarosegele dienten die ribosomalen RNAs aus HeLa S3 Zellen (5.500 und 1.800 N), MS 2 RNA (3.569 N) sowie ein käuflicher RNA - Standard (5 S RNA: 120 N und tRNA: 75 N). Für Polyacrylamidgele für kleine RNAs dienten ³H-Uridin-markierte Gesamtzell - RNA Präparationen als Standards (s. 3.10.3). Unter den üblichen Bedingungen sind die Banden der Spezies tRNA (75 N), U6 (106 N), U5 (118 N), 5 S rRNA (120 N) U1 (165 N) und U2 (196 N) identifizierbar.

Ip - Standards

Die verwendeten Proteine sind in Tabelle 1 beschrieben.

S-Wert Standards

Für kleinere S-Werte dienten tRNA (4S), 18S- und 28S rRNA bzw. MS 2 RNA (27S) als Referenz. Für größere S-Werte wurden EDTA - behandelte Cytoplasmafraktionen aus HeLa - Zellen zentrifugiert (ribosomale Untereinheiten: 40S, 60 S) oder EDTA - behandelte oder unbehandelte E.Coli Ribosomen (30S, 50S und 70S) verwendet. Die E.Coli Ribosomen wurden von Herrn Dr. Kiltz zur Verfügung gestellt.

4. Ergebnisse

4.1 hnRNP-Partikel: Isolation und Proteinbestandteile

Die von Georgiev als "Informoer" und von Jacob als "mono particle" bezeichneten 35-40 S RNP-Strukturen sind Objekt intensiver Studien gewesen (19-25, 64, 65). Da es praktisch unmöglich ist, intakte native hnRNP-Komplexe präparativ zu isolieren, sind viele Gruppen dazu übergegangen, durch Untersuchung dieser RNP-Partikel Einblick in die innere Struktur der RNP-Komplexe zu gewinnen.

Es existieren verschiedene Methoden zur Isolation der 40 S-Partikel. Neben der von Pederson (24) entwickelten Methode der milden RNAase - Behandlung heterogener, hochmolekularer hnRNP - Strukturen, ist die sogenannte Diffusionsmethode nach Samarina (21, 63) die verbreitetste. Sie beruht auf der Freisetzung von 40 S -Partikeln aus isolierten Zellkernen durch die Aktivierung einer endogenen Nuclease bei erhöhtem pH - Wert (pH 8) und erhöhter Temperatur (20 - 37°C). Eine gute Ausbeute ist allerdings abhängig von der Sauberkeit der Zellkerne, sowie den Extraktionsbedingungen (Dauer und Temperatur).

Für HeLa - Zellen zeigte sich die in Kapitel 3.x beschriebene hypotone Zellyse in Gegenwart von NP-40, sowie einige weitere Waschschrirte mit verschiedenen Puffern, geeignet, cytoplasmafreie Zellkerne zu erhalten. Auf Cytoplasmakontamination wurde durch Phasenkontrast - Mikroskopie und elektrophoretische Tests geprüft. (Anwesenheit der rein cytoplasmatischen scRNA L). Außerdem sind ribosomale Proteine auf Polyacrylamid - Gelen der nucleären Extrakte nicht sichtbar (siehe Abb. 3c).

Für Lymphocyten - Zellkerne war es notwendig, 3 mM CaCl_2 zum Lysispuffer zu geben, um eine vorzeitige Lyse der relativ labilen Kerne zu verhindern. Außerdem erschwert die unregelmäßige Oberflächenstruktur von Lymphocyten - Kernen die Cytoplasma - Entfernung (66). Dieser Umstand erforderte einen zusätzlichen Waschrirte mit dem Doppeldetergenz "Magic" (48) zur Reinigung der Kerne.

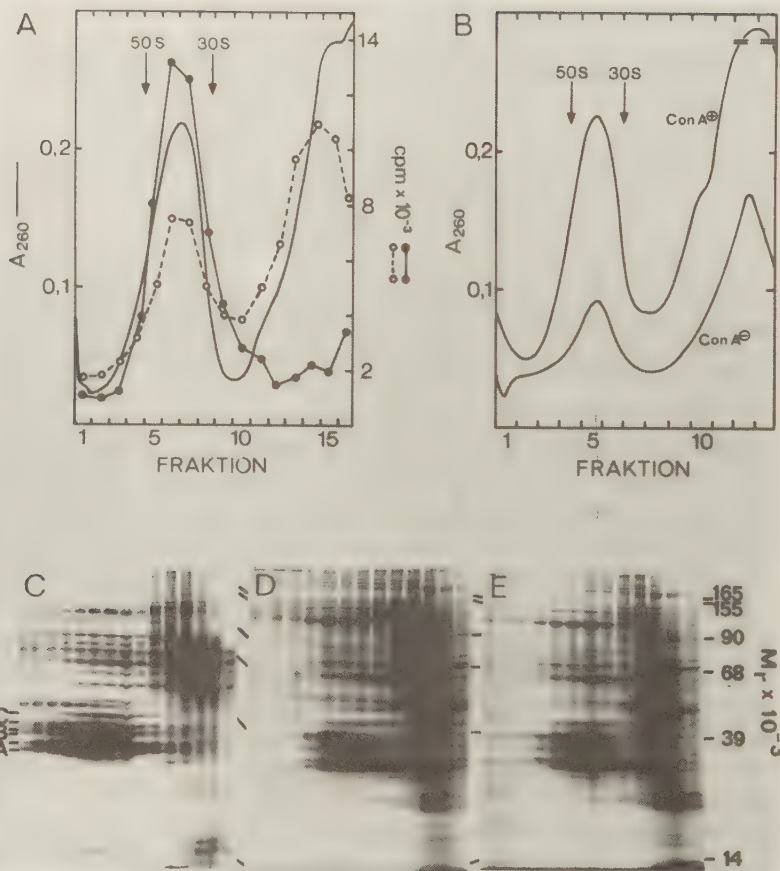


Abb. 3:

Nucleäre Extrakte aus HeLa Zellen und Lymphocyten wurden, wie in Kap. 3.3 bzw. Kap. 3.4 beschrieben, präpariert und auf 15-30 %igen Sucrosegradienten analysiert. Die einzelnen Fraktionen wurden ethanolgefällt und auf 10 %igen PAA - Gelen (siehe 3.8) analysiert.

a) Sedimentationsprofil eines typischen nucleären Extrakt aus etwa 5×10^6 HeLa-S3 Zellen (— Absorbtion bei 260 nm, ●—● Radioaktivitätsprofil von (^3H) -Uridin - kurzzeit markierter RNA (hnRNA), ○—○ Radioaktivitätsprofil von $(^3\text{H}$ -methyl) - Methionin markierten Proteinen.

b) Vergleichendes Absorptionsprofil) von jeweils 5×10^6 ruhenden bzw. ConA - stimulierten Lymphocyten.

c-e) Proteingele der einzelnen Gradientenfraktionen von HeLa - Zellen(c), ruhenden(e) und ConA - stimulierten(d) Lymphocyten.

Zur Präparation der Partikel erwiesen sich für HeLa - Zellen drei 25 minütige Extraktionen bei 20 - 22°C, pH 8 als geeignet. Für Lymphocyten galten die gleichen Bedingungen, allerdings wurde wegen der größeren Degradationsgefahr nur zweimal extrahiert.

Sucrosegradientenzentrifugation der Extrakte ergibt die bekannten Maxima zwischen 30 und 50 S, die die hnRNP - Strukturen repräsentieren (z. B. 25, 65). Abb. 3 zeigt zur Veranschaulichung typische Absorptionsprofile über den Sucrosegradienten für HeLa - Zellen und Concanavalin-A stimulierte bzw. ruhende Rinderlymphocyten, sowie die Proteinbestandteile der einzelnen Fraktionen der Gradienten. Die Ribonucleoprotein - Natur der Partikel ist in Abb. 3a noch einmal durch die Cosedimentation von radioaktiv markierten Proteinen mit kurzzeitmarkierter RNA im 40 S - Absorptionsmaximum gezeigt. Man sieht außerdem, daß die mit (³H)-Uridin kurzzeitmarkierte (15 min) hnRNA sich zu mehr als 80 Prozent im Bereich des 40 S -Maximums befindet. Dieses Verhalten der hnRNP - Komponenten stimmt mit publizierten Daten über 40 S - Partikel voll überein. Der in Abb. 3b aufgezeigte Unterschied in der Ausbeute an hnRNP - Partikeln zwischen ConA - stimulierten und ruhenden Lymphocyten ist ebenfalls bereits bekannt (67, 68). Er beläuft sich, abhängig von der Güte der Stimulation auf einen Faktor 2 bis 5 bezogen auf die gleiche Anzahl eingesetzter Kerne. Für die aktiv proliferierenden HeLa - Zellen ist die Ausbeute um einen weiteren Faktor 10 besser als in stimulierten Lymphocyten. Die Reduktion der Ausbeute in ruhenden Lymphocyten ist begleitet von einer Reduktion der Menge der kleinsten Proteinkomponente der hnRNP - Proteine (siehe Abb. 3d,e). Dieses Verhalten ist für andere Zellsysteme bereits beschrieben (siehe Einleitung). In HeLa - Zellen (Abb. 3c), sowie in stimulierten Lymphocyten ist das wohlbekannte Proteinsextett zu erkennen, das auf Standard - Laemmli - Gelen die sogenannten "Core" - Proteine der hnRNP - Partikel repräsentiert (25).

Die höhermolekularen Proteine in diesen Fraktionen sind lose assoziiert und lassen sich durch zusätzliche Reinigungsschritte (etwa Rezentrifugation, Pelletierung) reduzieren (siehe auch Abb. 14 d).

Zweidimensionale Gelelektrophorese (NEPHGE) zeigt ein

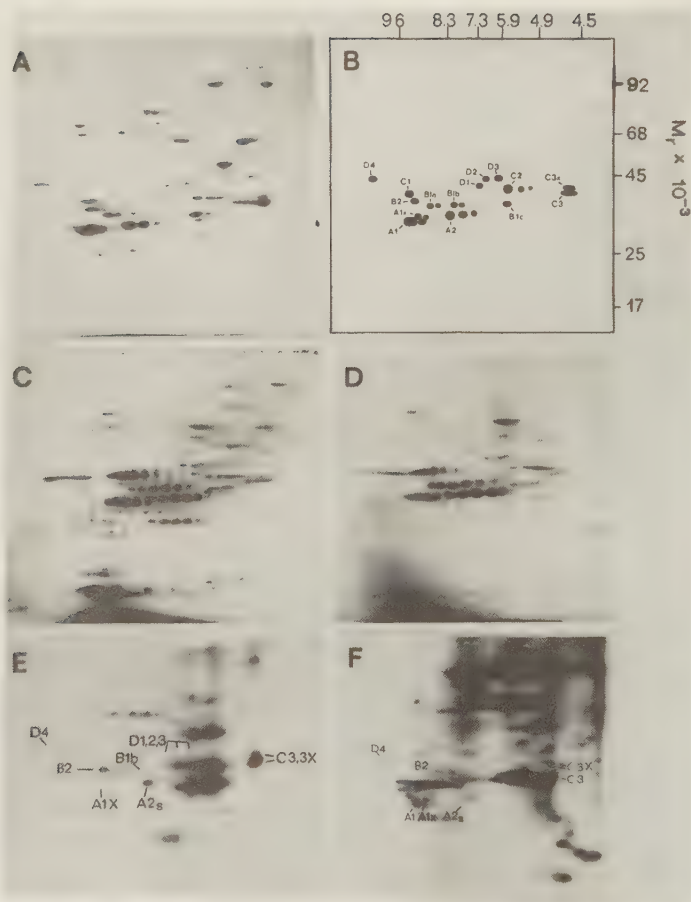


Abb. 4:

Zweidimensionale Gelelektrophoretische Auftrennungen im NEPHGE - System (s. Kap 3.8) von HeLa- bzw. Lymphocyten- RNP - Proteinen. Die Fraktionen des 40 S Maximums wurden vereinigt, nucleaseverdaut und nach Ethanol-fällung wie beschrieben elektrophoriert.
a) 40 S RNP - Proteine aus HeLa - Zellen
b) schematisches Muster der RNP - Proteine mit Nomenklatur und pI - Standardisierung.
c, d) 40 S RNP - Proteine aus ruhenden (c) bzw. ConA - stimulierten (d) Lymphocyten. Man beachte das verstärkte Modifikationsmuster.
e, f) 2-D - NEPHGE Analysen von *in vivo* (e) und *in vitro* (f) phosphorylierten 40 S RNP - Proteinen. Die Markierung wurde wie in Kap. 3.2 beschrieben durchgeführt.

wesentlich komplexeres Muster von Proteinflecken (Abb. 4a). Aus diesen Flecken wurden die "Core" - Proteine auf der Basis folgender vier Parameter definiert: (i) ihre Mengenverhältnisse zueinander in RNP - Partikeln müssen über verschiedene Aufarbeitungsschritte konstant bleiben; (ii) sie müssen in RNP - Präparationen aus anderen Saugerzellen identifizierbar sein; (iii) verschiedene Methoden der Isolation dürfen die Stöchiometrie der Proteine im 40 S - Partikel nicht verändern und (iv) sie müssen in rekonstituierten RNP - Partikeln in gleichen Massenverhältnissen vorhanden sein (siehe Kapitel 4.7).

Nach diesen Voraussetzungen, die durch Vergleich mit publizierten Daten (25, 26, 28, 30) und eigene Beobachtungen erstellt wurden, konnten neun Proteine, von denen mehrere Ladungsisomere haben, als "Core" - Proteine definiert werden. In Erweiterung der von Beyer et al. (25) vorgeschlagenen Nomenklatur wurden diese Proteine mit A1, A2, B1a, B1b, B1c, B2, C1, C2 und C3 bezeichnet (Abb. 4b). Die mit A1x und C3x bezeichneten Spezies scheinen verwandt mit A1 bzw. C3 (siehe Kapitel 4.2.2). Die Proteine unter dem A2 bzw. B1c - Fleck wurden nicht in die Gruppe der "Core" - Proteine aufgenommen, da sie nicht alle obigen Voraussetzungen erfüllen, insbesondere Punkt (iv).

Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der Stöchiometrie der "Core" - Proteine aus HeLa - Zellen bzw. ruhenden und stimulierten Lymphocyten. Diese aus 2 - D - Gelen bestimmte Stöchiometrie erweitert die von Beyer et al. (25) aus Laemmli - Gelen abgeleiteten Werte von A1:A2:B1:B2:C1:C2 = 4:4:1:1:4:2 auf die in der Tabelle erläuterten Werte.

4.2 Charakterisierung der "Core" - Proteine

4.2.1 Molekulargewichte und isoelektrische Punkte

Mit Hilfe von Standardproteinen wurde eine Abschätzung der isoelektrischen Punkte der jeweiligen "Mutterflecken" und der Molekulargewichte der "Core" - Proteine vorgenommen. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Dazu muß erwähnt werden, daß die Bestimmung der isoelektrischen Punkte keinen Anspruch auf sehr große Genauigkeit erhebt, da auf Grund der hohen Basizität der Proteine im NEPHGE - System gearbeitet wurde, das nicht bis ins Gleichgewicht elektrophoriert. Die gemessenen Werte müssen daher eine geringfügige Abhängigkeit von der Größe des Proteins zeigen. Sie stimmen dennoch gut mit bereits publizierten Daten über einige dieser Proteine überein (25, 69). Die Werte für die Molekulargewichte der "Core" - Proteine wurden in Abwesenheit und in Gegenwart von 8 M - Harnstoff im Gel (Laemmli - Gel oder zweite Dimension (NEPHGE)) bestimmt. Die in Tabelle 1 sichtbaren Unterschiede erstrecken sich auf die gesamte Gruppe neutraler bis basischer "Core" - Proteine, während die beiden sauren Spezies C3 und C3x sowie die meisten höhermolekularen Proteine weitgehend unverändert bandieren (siehe auch Abb. 7b, c). Ob die zweifellos korrekteren Werte der Elektrophorese unter 8 M Harnstoff das echte Molekulargewicht darstellen, oder ob weitere Sekundär - und Tertiärstruktur - Komponenten selbst unter diesen Bedingungen erhalten bleiben, kann mit Sicherheit erst durch eine Sequenzanalyse (etwa der Gene der "Core" - Proteine) entschieden werden. Im Rahmen dieser Arbeit sind weitgehend harnstofffreie Gele verwendet worden, da diese das übliche Bandenmuster erhalten.

4.2.2 Peptid - Kartierung der "Core" - Proteine

Zur Untersuchung der "Core" - Proteine bezüglich ihrer Verwandtschaft wurden zwei verschiedene Methoden der Peptid - Kartierung durchgeführt: Zweidimensionale Analysen von iodierten tryptischen Peptiden (53) und Analysen von partiellen Verdauungen mit *Staphylococcus aureus* V8 -

Tabelle 1:

Zusammenfassung der Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der hnRNP - Proteine. Spalte (1) zeigt die Molmassen aus PAA- Gelen unter Standardbedingungen und unter 8 M Harnstoff, Spalte (2) die isoelektrische Punkte im NEPHGE - System und in den Spalten (3) und (4) ist das Phosphorylierungsverhalten der einzelnen Proteine in vivo und in vitro aufgelistet. Die Spalten (5-7) zeigen einen Stöchiometrievergleich der RNP -Proteine aus ruhenden und stimulierten Lymphocyten, sowie aus HeLa - Zellen, bezogen auf das Protein A2.

Protein	$M_r \times 10^{-3a}$ (± 500)	pI_{app}	Phosphorylierung		Stöchiometrie		
			in vivo/in vitro		HeLa	L+	L-
A1	31/38	9.3	-	+	10	10	4
A1x	32/38	9.1	+	+	-	-	-
A2	32.5/39	8.4	+ ^c	+ ^c	10	10	10
B1a	35.5/41	8.8	+	-	3	7	5
B1b	35.5/44	8.3	+	-	1	(in B1a)	
B1c	35.5/43	5.7	-	-	2	2	2
B2	37/42	9.15	-	+	2	2	1
C1	39/46	9.2	-	-	3	6	1
C2	40.5/45	5.6	-	-	2	3	3
C3	38.5/37	4.8/6.5 ^d	+	+	7	1.5	1.5
C3x	40/40	4.8/6.5 ^d	+	+	2	1	1
D1	42/46	7.3	+	-	n.d.		
D2	44/48	6.8	+	-	n.d.		
D3	44/48	5.8	+	-	n.d.		
D4	44/55	>9.5	+	+	n.d.		

a) Die ersten M_r -Werte bezeichnen jeweils die Werte, die aus Standard - Laemmli Gelen abgeleitet wurden; die zweiten Werte wurden unter 8M Harnstoff bestimmt.

b) Als Standardproteine dienten: Ovalbumin(pI_{app} :4,7), BSA(4,9), Conalbumin(5,9), Myoglobin von Pferd(7,3) und Wal(8,3), RNAase A(9,45) und Cytochrom C(10,65)

c) "Mutterprotein" und erstes Ladungsisomer sind nicht markiert.

d) Nach Isolation der Proteine durch Essigsäureextraktion ist für C3/C3x eine Ladungsverschiebung auf $pI=6,5$ festzustellen.

Protease (55). Die Verwendung beider Methoden erschien ratsam, da jede nur in gewissen Grenzen interpretierbar ist. So wird von den tryptischen Kartierungen eine Überbetonung von Ähnlichkeiten zu erwarten sein, da diese Analysen von kurzen, etwa 1 bis 10 Aminosäuren langen Fragmenten darstellen (siehe Kapitel 3.8).

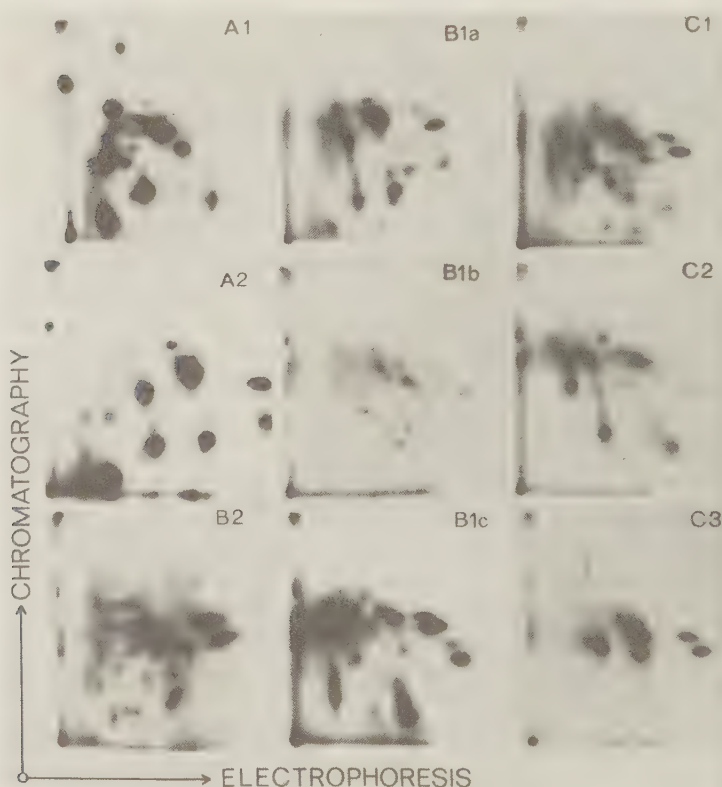


Abb. 5:

Zweidimensionale Auftrennung von tryptischen Totalhydrolysaten der neun Hauptproteine aus 40 S RNP - Partikeln mittels Hochspannungselektrophorese und Dünnschichtchromatographie. Die Bedingungen der Proteinisolation, der Jodierung sowie der nachfolgenden Analyse sind in Kap. 3.10 beschrieben. Auf den einzelnen Chromatogrammen wurden jeweils 60.000 - 250.000 cpm ^{125}I aufgetragen. Es wurde 24 - 72 h exponiert.

Aus statistischen Gründen werden sich diese Peptide, zumal bei einer Gruppe ähnlich basischer Proteine, stärker ähneln als die Ursprungsproteine. Diese Tendenz wird allerdings teilweise

durch die Spezifität der Jodierung (bevorzugt Tyrosin (53, 54)) kompensiert.

V8 - Protease - Karten andererseits können Unterschiede in der Primärstruktur überbetonen. Dies ist auf die Spezifität des Enzyms für Glutaminsäure zurückzuführen. Von dieser polaren geladenen Aminosäure kann erwartet werden, daß sie sich bevorzugt an der Oberfläche eines nativen Proteins befindet; von dieser ist jedoch bekannt, daß sie bezüglich der Primärstruktur variabler ist als die inneren Regionen eines Proteins, die hauptsächlich unpolare Aminosäuren enthalten. Im Extremfall können bezüglich ihrer Primär- und Tertiärstruktur nah verwandte Proteine stark unterschiedliche V8 - Karten zeigen. In Abb. 5 erkennt man, daß die zweidimensionalen Chromatogramme der tryptischen Totalhydrolysate gewisse Ähnlichkeiten zwischen A2 und B1a oder C1 und C3 aufweisen, im allgemeinen jedoch unterschiedliche Muster haben. Die V8 - Analysen ergeben ein vergleichbares Bild (Abb. 6): Die Bandenmuster der neun Hauptproteine sind deutlich verschieden voneinander, obwohl einige Spezies Banden zeigen, die im gleichen M_r - Bereich liegen. Dies ist besonders für A1 und A2, B1a und B1b, sowie für C1 und C3 der Fall. Die Peptidmuster der übrigen Proteine werden in den folgenden Kapiteln diskutiert werden. Für die neun Hauptproteine lassen sich die Ergebnisse beider Kartierungsmethoden dahingehend zusammenfassen, daß es sich um zwar verwandte aber distinkte Proteine handelt.

4.2.3 Modifikationen der "Core" - Proteine

Laut Abb. 4 zeigen alle "Core" - Proteine außer den C3 - Spezies unterschiedliche Mengen an Ladungsisomeren. Besonders die Proteine A2 und C2, sowie für Lymphocyten B1a/b besitzen prominente Satelliten. Die Identität dieser Satelliten mit dem Mutterprotein (hinsichtlich der Primärstruktur) kann durch V8 - Protease - Kartierung und

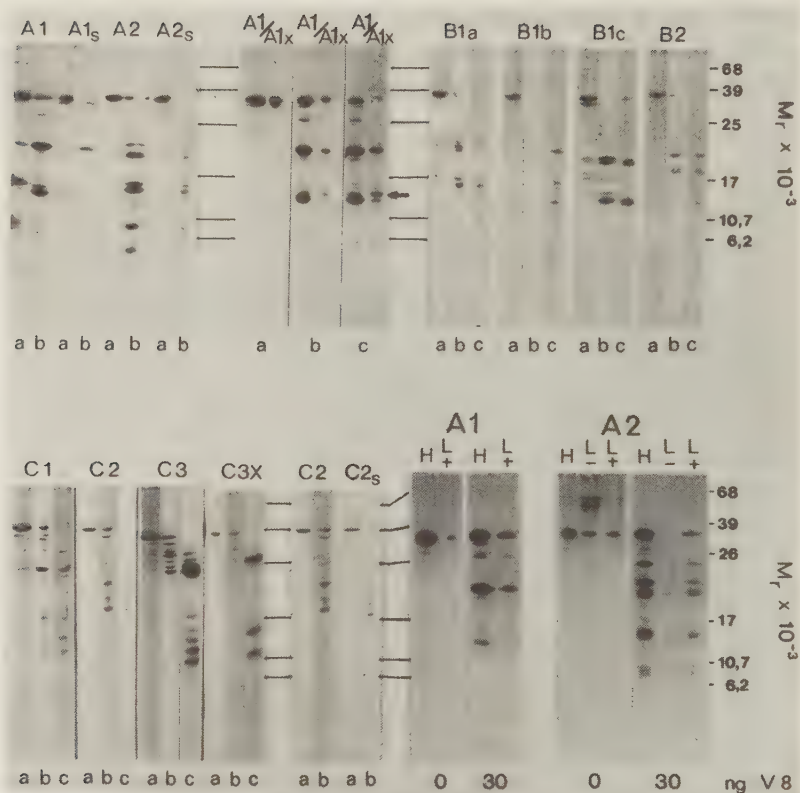


Abb. 6:

Peptidkartierung von partiellen V8 - Protease Verdauungen der einzelnen hnRNP - "Core" - Proteine. Die Durchführung ist in Kap. 3.10 beschrieben. Die Bezeichnungen oberhalb der einzelnen Spuren definieren das jeweils eingesetzte Protein (Nomenklatur s. Abb.4). Standardisiert wurde mit BSA ($M_r = 68.000$), E.Coli Polymerase (α - Untereinheit, 39.000), Chymotrypsinogen (25.000), Myoglobin (17.000) und BrCN - Fragmenten von Myoglobin (10.700, 6.200 und 2.500). In den Spuren a, b und c sind jeweils 5, 30 bzw. 70 ng Staphylococcus V8 - Protease zur Verdauung eingesetzt.

Im rechten unteren Bereich der Abbildung sind vergleichende Peptidkarten der beiden Hauptproteine (A1 und A2) der RNP - Partikel von Lymphocyten und HeLa - Zellen gezeigt. Die Kürzel bedeuten: L+ = ConA stimulierte Lymphocyten, L- = ruhende Lymphocyten, H = HeLa Zellen.)

Analyse der Aminosäurezusammensetzung mit hoher Wahrscheinlichkeit gezeigt werden (Abb.5, Tabelle 2).

In vitro - Carbamylierungsexperimente, die durch Inkubation der "Core" - Proteine, bzw. des Proteins A1, für 30 min bei 70°C in Gegenwart von 8 M Harnstoff durchgeführt wurden, zeigen, daß alle Satelliten durch Verlust einzelner positiver oder Gewinn einzelner negativer Ladungen verursacht werden können (Abb. 7a).

Man erkennt, daß das relativ schwache Modifikationsmuster von HeLa - Zellen durch Carbamylierung dem Muster von Lymphocyten angeglichen werden kann (siehe auch Abb. 4c,d). An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, daß der Grad der Ladungsisomerisation sich umgekehrt proportional zum Proliferationsgrad der Zellen verhält (46). Darauf wird später eingegangen werden.

Ein Teil dieser Modifikationen wird durch Phosphorylierung verursacht, wie durch *in vivo* und *in vitro* Markierung mit radioaktivem Phosphat gezeigt werden kann (Abb. 2e,f).

Die *in vitro* Markierung wurde unter Ausnutzung einer endogenen Proteinkinase durchgeführt. Neben den Aussagen über die phosphorylierten "Core" - Spezies ist dieses Experiment eine Bestätigung der Existenz dieser Kinase - Aktivität in hnRNP - Präparationen (28, 65, 70).

Phosphorylierung *in vivo* liegt vor bei den Proteinen A1x, B1a, B1b, C3, C3x, sowie A2 ab dem zweiten Satellitenflecken. *In vitro* ist zusätzlich A1 und B2 phosphoryliert, während B1a und B1b unmarkiert bleiben (siehe Tabelle 1).

Das Protein A1 zeigt ein interessantes Verhalten, da es in zwei verschiedene Serien von Satelliten aufspaltet. Die Serie der A1s - Flecken wird durch Ladungsisomerisation des A1 - Mutterflecks verursacht. Die zweite, höhermolekulare Reihe von Satelliten hat ihren Ursprung in Protein A1x (siehe Abb. 4 und 7). Für dessen Existenz gibt es drei mögliche Erklärungen: Erstens könnte eine Modifikation von A1 zu einer M_r - Zunahme oder einem veränderten Laufverhalten auf Laemmli - Gelen führen; zweitens könnte eine konformere Form von A1, die in ihrer Primärstruktur identisch, in ihrer Sekundär - oder Tertiärstruktur jedoch auch unter 0,1 % SDS verschieden ist, den A1x - Fleck verursachen; und drittens besteht die Möglichkeit, daß es

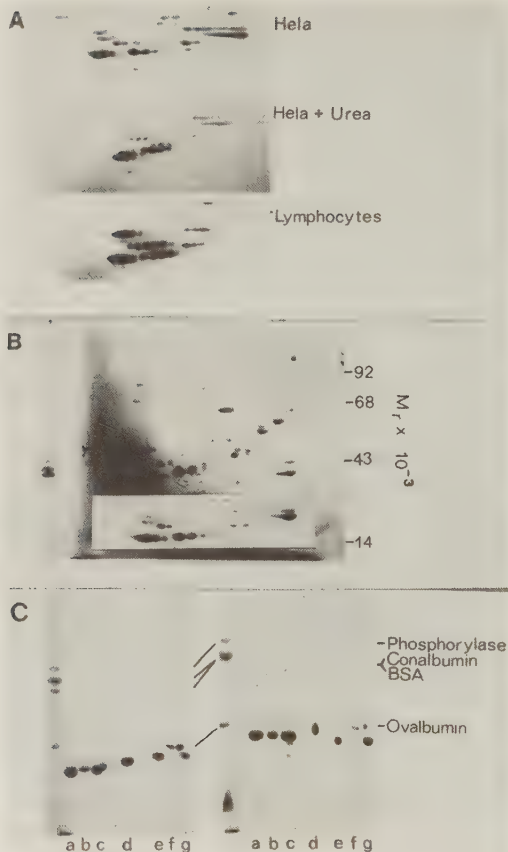


Abb. 7:

a) Ausschnitte der Region der "Core" - Proteine aus 2D - Gelen von 40 S hnRNP- Präparationen: oberes Gel - native "Core"-Proteine aus HeLa Zellen; mittleres Gel - "Core"-Proteine nach in vitro Carbamylierung (30 min, 70°C, 8 M Harnstoff); unten - "Core"-Proteine aus Lymphocyten.
 b) Zweidimensionale Auftrennung der 40 S - RNP Proteine mit 8 M Harnstoff in der zweiten Dimension. Zum Vergleich ist der "Core" - Bereich eines Standardgels eingefügt. Man beachte das veränderte Laufverhalten speziell der basischen Proteine.
 c) Vergleichende Analyse von A1/A1x und C3/C3x unter 4 bzw. 8 M Harnstoff. Proteinflecken aus 2D - Gelen wurden ausgeschnitten und im entsprechenden Puffer mit 4 bzw. 8 M Harnstoff equilibriert und in die Taschen eines entsprechenden Gels gegeben und elektrophoriert. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt die Wanderung unter 4 M, die rechte entspricht 8 M Harnstoff (a=Protein A1, b=A1x, c=A1+A1x in der selben Tasche, d=A2, e=C3, f=C3x und g=C3+C3x in der selben Tasche).

sich um ein zwar verwandtes aber distinktes Protein handelt, vergleichbar etwa den unterschiedlichen Formen des Histons H1 (71, 72).

Die Möglichkeiten 1 und 3 sind auf Grund der Carbamylierungsexperimente unwahrscheinlich (Abb. 7). Wäre A1x aus A1 durch eine Modifikation entstanden oder wäre A1x ein fremdes Protein, sollte durch Carbamylierung eine Zunahme der Satelliten von A1 und A1x auf Kosten ihrer Mutterflecken zu erwarten sein, deren Gesamtmenge der Gesamtmenge an Ausgangsprotein entspricht. Dies ist nicht der Fall, wie Abb. 7 zeigt: Der Anteil an A1x inklusive seiner Satelliten nimmt eindeutig auf Kosten von A1 zu (vergleiche Abb. 4a). Ein solches Verhalten läßt sich nur erklären, wenn A1 und A1x konformere Formen des gleichen Proteins sind. Zusätzlich unterstützt wird dieser Befund durch eine fast identische Aminosäurezusammensetzung (siehe Tabelle 2), ebensolche VB - Peptid - Karten (Abb. 6), sowie durch ein identisches Elektrophoreseverhalten unter 8 M Harnstoff im PAA - Gel (siehe Abb. 7b). Man erkennt, daß beide Proteine einen Molmassenzuwachs von $M_r=31.000$ für A1 und $M_r=32.000$ für A1x auf jeweils $M_r=38.000$ zeigen. Von beiden Isomeren scheint A1x das stabilere zu sein, denn völlig homogenes Protein A1, gewonnen durch Elektroelution aus 2D - Gelen (s. 4.5), zeigt regelmäßig einen erheblichen Teil Rekonversion zu A1x, während letzteres sehr sauber ohne Kontamination mit A1 isoliert werden kann. Eine mögliche Erklärung für diese Phänomene wäre eine cis/trans Konversion der Polypeptidkette an einem Prolinrest. Von Übergängen dieser Art ist bekannt, daß sie eine relativ hohe Energiebarriere besitzen (85 kJ/mol (80)). Eine Peptid - Bindung in cis - Konfiguration, würde somit die Topologie des Protein - auch in Gegenwart von SDS - so verändern, daß ein unterschiedliches Laufverhalten auf Laemmli - Gelen resultiert.

Das Phosphorylierungsverhalten beider Spezies steht im Einklang mit diesen Befunden. Es läßt sich durch eine höhere Spezifität der *in vivo*- Markierung zwanglos erklären (siehe Tabelle 1, Abb. 4e,f)

Das oben erwähnte Phosphorylierungsverhalten der Spezies A2 wird am sinnvollsten durch folgende Hypothese erklärt: Eine erste Modifikation - etwa eine Acetylierung - verändert die

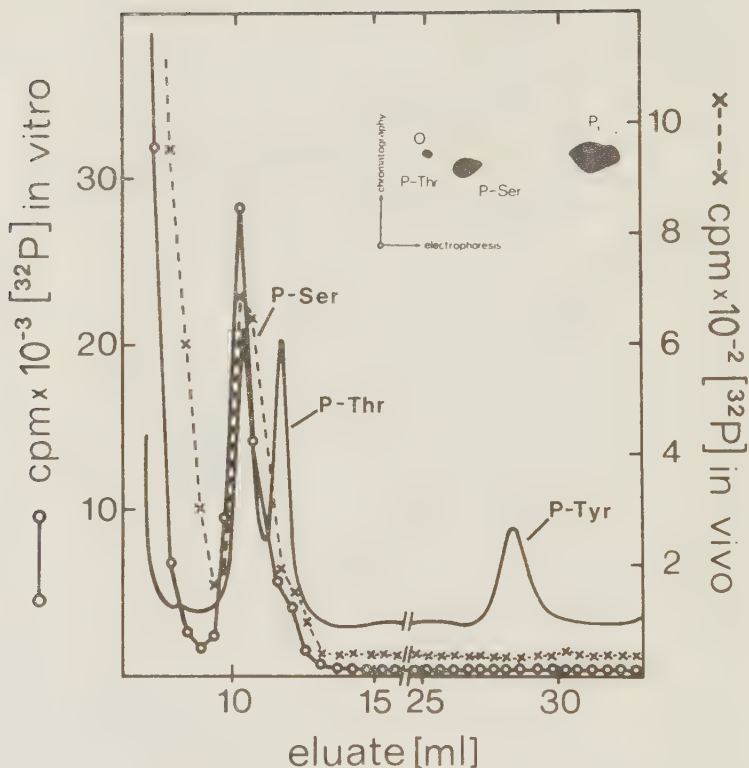


Abb. 8:

Halbquantitative Bestimmung von Phosphoaminosäuren: *In vivo* bzw. *in vitro* phosphorylierte RNP - Proteine wurden, wie beschrieben (3.11), hydrolysiert und analysiert.

—: Elutionsdiagramm von phosphorylierten Standardaminosäuren (Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin)

o--o: ³²P - Radioaktivität von *in vitro* markierten RNP - Proteinen

x--x: ³²P - Radioaktivität von *in vivo* markierten Proteinen

Der Einschub (oben rechts) zeigt eine Dünnschichtanalyse eines Hydrolysates von hnRNP - "Core" - Proteinen. ³²P - markierte

Proteinhydrolysate wurden auf Cellulose - Dünnschichtplatten (10 x 10 cm) in der ersten Dimension durch Hochspannungselektrophorese (in 1M

Ameisensäure/Pyridin, pH 2,1, 18 min bei 1300 V) und in der zweiten

Dimension durch Chromatographie (0,5 M Isobuttersäure/0,5 M NH₄OH (5:3)) aufgetrennt. Standardisiert wurde durch mitlaufende nichtradioaktive

Phosphoaminosäuren. Der Kreis markiert die Position des Phosphotyrosinstandards.

Ladung um eine Einheit und ist gleichzeitig die Voraussetzung für eine nachfolgende Phosphorylierung. Derartige kooperative Modifizierungsreaktionen sind für Histone beschrieben (72). Die Möglichkeit eines zweiten Proteins, das mit dem ersten bzw. nach Phosphorylierung mit dem zweiten Satelliten comigriert, wurde ausgeschlossen, da identische V8 - Peptid - Karten und Aminosäurezusammensetzungen von A2 bzw. A2s vorliegen (Abb. 4e,f, 6 und Tabelle 2).

Von den Proteinen der C - Gruppe sind die Spezies C3 und C3x sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stark phosphoryliert. Die Abwesenheit von Satelliten dieser Proteine ist wahrscheinlich auf die periphere Lage der beiden Spezies im pH - Gradienten zurückzuführen. Ein analoges Verhalten ist für das extrem basische aber phosphorylierte Protein D4 zu erkennen.

Für die Proteine C3/C3x kann, obwohl sie, wie die V8 Peptid - Banden zweifelsfrei zeigen, eng verwandt sind, die Hypothese, es handele sich um Konformere nicht gelten. Wie Abb. 7 zeigt, wird das unterschiedliche Laufverhalten in der Elektrophorese auch durch 8 M Harnstoff nicht aufgehoben.

Über die Phosphorylierung der Spezies C2 besteht keine eindeutige Klarheit, da die C2 - Region von der starken C3/C3x - Radioaktivität und von eventuell unverdauten markierten Oligonucleotiden überlappt wird. Vergleichende Untersuchungen einer großen Anzahl von Gelen weisen jedoch darauf hin, daß C2 unmarkiert bleibt. Vergleiche mit Literaturdaten sind nur schwer möglich, da publizierte Ergebnisse sich auf eindimensionale Gelelektrophoresedaten stützen (73), die für hnRNP - Proteine nicht eindeutig interpretierbar sind.

Als Akzeptoraminosäuren für die Phosphorylierung konnten Serin und Threonin, nicht jedoch, wie in Lymphocyten (74), Tyrosin bestimmt werden (Abb. 8).

Zu erwähnen ist noch das Elektrophoreseverhalten der Proteine C3/C3x nach Essigsäureextraktion (152). Beide Spezies zeigen eine Verschiebung im Isoelektrischen Punkt auf etwa $pI = 6,5$ (s. Tabelle 1). Da Modifikationen mit solchen Auswirkungen durch 70 % Essigsäure kaum hervorgerufen werden können, besteht die Möglichkeit, daß

unter den Extraktionsbedingungen harnstoffstabile Sekundärstrukturbereiche denaturiert und fest gebundene Oligonucleotide abgelöst werden können. Dieser Befund steht im Einklang mit der hohen Affinität dieser beiden Proteine zu RNA. Die Bezeichnung "saure Core - Proteine" wird der besseren Übersichtlichkeit wegen jedoch weiter verwendet werden.

Einige Satelliten können allerdings durch Phosphorylierung nicht erklärt werden. Insbesondere die Ladungsisomeren von A1, A2 und C2 werden nicht oder nur teilweise von Phosphat markiert. Als mögliche Modifikationen für diese Spezies auszuschließen sind ADP - Ribosylierungen sowie saure Glykosylierungen. Von Song und Adolph (69) wurde die Abwesenheit der ersteren in HeLa - RNP - Proteinen gezeigt; des weiteren sollte diese Gruppe bei *in vivo* ^{32}P - Markierungen markiert werden. Kohlehydratmodifikationen andererseits sollten eine deutliche Veränderung im relativen Molekulargewicht der Isomeren verursachen. Außerdem sind Zuckermodifikationen von nucleären Nicht - Membran - Proteinen bisher nicht beschrieben.

Als möglicher Kandidat für die zu erklärenden Satelliten verbleibt die Acetylierung. Experimente zu ihrem Nachweis werden erschwert durch die Tatsache, daß die Aminotermini dieser Proteine durch Acetyl - bzw. Acylgruppen blockiert sind (80), die bei Inkubation mit ^3H - Acetat *in vivo* mitmarkiert werden. Versuche mit dem Histon - Deacetylase Inhibitor Na - Butyrat zeigen eine geringfügige Zunahme der Satellitenflecken (75, 76). Dieser Test auf Acetylierung bedarf allerdings weiterer Bestätigung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die RNP - Proteine in Säugerzellen (HeLa - S3 und Rinderlymphocyten) durch Phosphorylierung sowie wahrscheinlich durch Acetylierung modifiziert sind. Die Anwesenheit von Methylierungen wird in Kapitel 4.5 diskutiert werden.

4.3 Die A-Proteine von Lymphocyten und HeLa-Zellen

Ein Vergleich der wenigen publizierten zweidimensionalen Analysen von hnRNP - Proteinen zeigt eine große Ähnlichkeit der Proteinmuster bei verschiedenen Säugerzellen (26-28, 46). Daher wurde durch VB - Proteasekarten überprüft, wie weit die Ähnlichkeit der beiden Hauptproteine A1 und A2 bei HeLa - Zellen und Lymphocyten reicht. Laut Abb. 6 zeigen die Peptidkarten von A1 und A2 völlig identische Muster für HeLa - Zellen und Lymphocyten. Parallel wurde ein Vergleich mit dem Protein A2 aus ruhenden Lymphocyten durchgeführt, um festzustellen, ob die mitogene Stimulation durch Concanavalin A Auswirkungen auf die Primärstruktur der Proteine hat. Es sind jedoch keine Unterschiede feststellbar.

Unterstellt man, daß dieses Resultat für die gesamte Gruppe der "Core" - Proteine repräsentativ ist, wird deutlich, daß es sich um eine Reihe sehr konservativer Proteine handelt, vergleichbar etwa den Histonen.

Immunologische Untersuchungen, die eine hohe Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen "Core" - Proteine verschiedener Spezies gezeigt haben, stützen diese Annahme (30, 77, 78).

4.4 Die Proteine der D - Gruppe

Auf Laemmli - Gelen von Fraktionen von Sucrosegradienten nucleärer Extrakte fällt neben den "Core" - Proteinen eine Bande von $M_r = 44000$ auf, die im Verhältnis zur Menge an "Core" - Proteinen zu höheren Sedimentationswerten hin zunimmt (siehe z.B. Abb.3 und 17). Im zweidimensionalen NEPHGE - System liegen im entsprechenden Molekulargewichtsbereich vier Proteine, von denen eines extrem basisch ist (D4; pI 9,5), während die drei anderen Proteine (D1 - D3) sich im neutralen Bereich befinden (siehe Abb.4 und Tabelle 1). VB - Protease Vergleiche der vier D - Proteine mit der D - Bande auf Laemmli - Gelen (D_L) zeigen, daß D2, D3 und D4 Bestandteile der D_L - Bande sind. Die übrigen Banden der D_L - Karte coelektrophorieren mit den

Hauptbanden einer V8 - Karte von Aktin, dessen Beteiligung am Transcriptionsvorgang vermutet wird (79).

Zweidimensionale Auftrennung verschiedener Bereiche des Gradienten zeigt, daß von den vier D - Proteinen nur die Spezies D4 zu größeren S - Werten hin zunimmt, während die anderen drei Proteine ihre Maxima im Bereich von 30 - 40 S haben und zu 50 S hin abnehmen.

Phosphorylierungsexperimente zeigen, daß D4 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* phosphoryliert wird, während für D1, D2 und D3 nur *in vivo* Phosphorylierung zu erkennen ist (siehe Abb 4).

Eine Aussage zur Funktion von D4 in hnRNP - Komplexen ist derzeit nicht möglich. Zu erwähnen bleibt allerdings, daß es sich in *in vitro* rekonstituierten RNP - Partikeln völlig identisch verhält (s. Kap. 4.6).

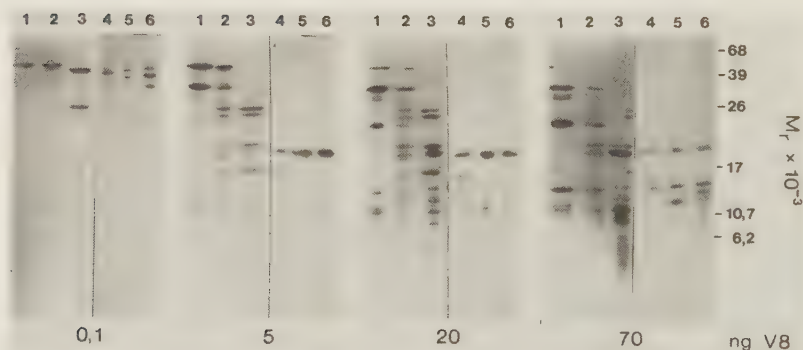


Abb. 9:

V8 - Protease Peptidkarten der D - Proteine von HeLa - Zellen. Die Durchführung ist in Kapitel 3.10 beschrieben. (1) Protein D4; (2) D - Proteine aus Laemmli - Gelen (D_L); (3) Aktin - aus Rindermuskel; (4) Protein D1; (5) Protein D2; (6) Protein D3. Die M_r - Werte sind wie in Abb.6 bestimmt.

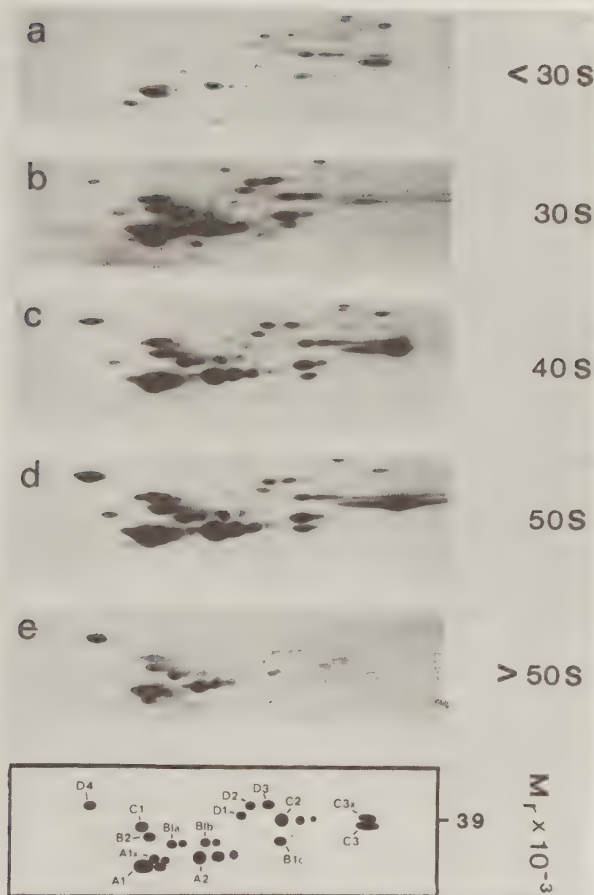


Abb. 10:

Zweidimensionale NEPHGE - Analyse der "Core" - Proteine von RNP - Komplexen über einen Sucrosegradienten. Die Fraktionen entsprechen den Fraktionen in Abb.3A wie folgt: < 30 S: Frkt. 11, 12, 13; 30 S: Frkt. 8, 9, 10; 40 S: Frkt. 6, 7; 50 S: Frkt. 4, 5; > 50 S: Frkt. 1, 2, 3. Gezeigt ist jeweils der M_r -Bereich von 25.000 - 50.000. Zur Orientierung ist eine schematische Zeichnung zur Nomenklatur hinzugefügt.

4.5 Aminosäurezusammensetzung der "Core"-Proteine

Diese Bestimmungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Helmut Werr im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt. Zur Reinigung der Proteine wurden 40S Fraktionen aus Sucrosegradienten zweidimensional aufgetrennt (NEPHGE). Die mit Coomassie angefärbten Proteinflecken wurden ausgeschnitten und wie in 3.8 beschrieben elektroeluiert und der Aminosäureanalyse unterzogen (siehe Kapitel 3.11). Die Reinheit der eluierten Proteine wurde durch Elektrophorese überprüft (s. Abb. 11 a)).

Durch Vergleiche mit Proteinen bekannter Aminosäuresequenz (Myoglobin (Pferd), Aktin (Rind)) wurde die Zuverlässigkeit der Aminosäurebestimmung nach Durchlaufen einer typischen Präparationsroutine (2-D Gel, Elution, Fällung) überprüft. Diesen Tests nach verfälscht die Addition von MS 2 - RNA als "Carrier" für die Ethanol-fällung die Aminosäurezusammensetzung nicht.

Die Cysteinbestimmung über Perameisensäureoxidation führte bei Aktin zu den korrekten Ergebnissen, ist also wahrscheinlich auch für die "Core"-Proteine verlässlich. Die Tryptophanbestimmung durch Mercaptoethansulfonsäurehydrolyse führt zu zu geringen Werten (20 - 50%) und ist daher in der Tabelle nur als "vorhanden" oder "unter Nachweisgrenze" spezifiziert. Die geringen Werte sind wahrscheinlich auf teilweise Zerstörung der Tryptophanseitenkette während der Elektrophoreseschritte zurückzuführen, da frisches Protein völlig korrekte Analysen ergab.

Die Ausbeute der Proteinisolation über alle Schritte wurde von Herrn Werr zu etwa 10% der Menge vor der zweidimensionalen Gelelektrophorese bestimmt.

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der Daten zur Aminosäurezusammensetzung der "Core"-Proteine. Sie zeichnen sich, mit Ausnahme der Proteine C3/C3x, vorallem durch einen extrem hohen Anteil an Glycin aus (20-28 mol%). Werte dieser Größe werden für Strukturproteine wie Collagen und Fibroin, sowie für Proteine mit hohem β - Sekundärstrukturanteil gemessen. Von letzteren ist bekannt, daß sie mit Nucleinsäuren in Wechselwirkung treten können (30, 81, 82). Das Verhältnis von sauren zu basischen Aminosäuren (etwa

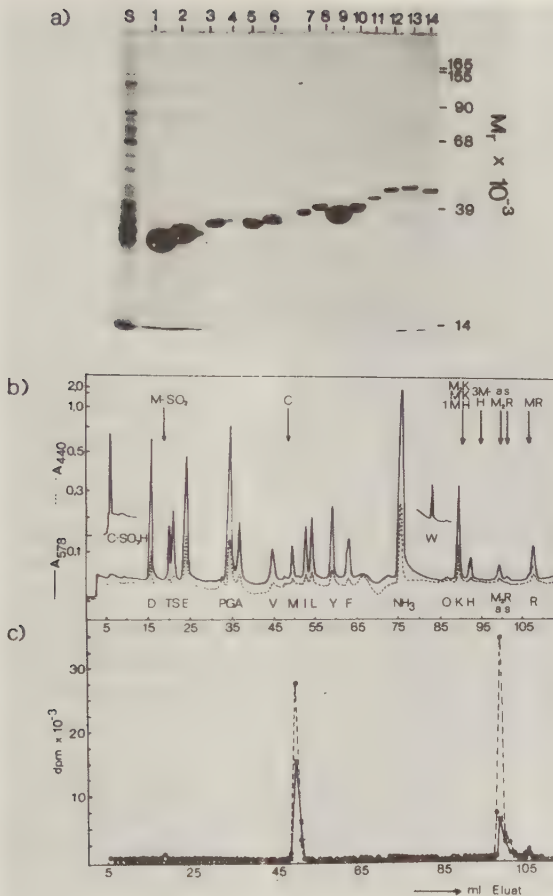


Abb. 11:

a) Gelelektrophoretische Überprüfung der elektroeluierten "Core"-Proteine. Die Spuren enthalten: S = 40S Standard, 1 - 14: A1, A2, B1a, B1b, B1c, B2, C1, C2, C3, C3x, D1, D2, D3 und D4. Aliquots der elektroeluierten Proteine wurden mit MS 2 RNA als "Carrier" gefällt und wie üblich elektrophoriert.

b) Ein typisches Profil einer Aminosäurebestimmung am Beispiel des Proteins B1c. Die Bezeichnungen der Maxima entsprechen dem Einbuchstabencode der Aminosäuren (siehe Abkürzungsliste). Als Pfeile eingezeichnet sind die Elutionspositionen der methylierten Aminosäurestandards. Die Kurventeile von Tryptophan und Cysteinsäure sind den entsprechenden Analysen entnommen.

c) Radioaktivitätsprofil (³H-methyl) - Methionin) von Aminosäureanalysen von in vivo markierten hnRNP - Proteinen. X--X: 4 h Markierung; o--o: 24 h Markierung.

1,5:1) spricht angesichts der Basizität der Proteine für einen hohen Asparagin- und Glutaminanteil. Eine direkte Bestimmung dieser beiden Aminosäuren ist durch die verwendete Präparationsmethode nicht möglich.

Ein Vergleich mit der gemittelten Zusammensetzung von 68 Proteinen verschiedener Klassen (83) zeigt, daß die "Core" - Proteine einen hohen Anteil an aromatischen, sowie einen sehr geringen Teil an unpolaren Aminosäuren besitzen. Diese Befunde sprechen gegen ausgedehnte α -helicale Bereiche in den "Core" - Proteinen, da diese sich meist aus unpolaren und kleinen Aminosäuren aufbauen. Soweit man aus Aminosäurezusammensetzungen auf Sekundärstruktur schließen kann, sprechen diese Daten für gewisse Anteile an β - Strukturen, in denen aromatische Aminosäuren sowie z.B. Glutaminsäure häufiger vertreten sind.

Weiterhin festgestellt wurde die Anwesenheit von N^G, N^G - Dimethylarginin, die schon von anderen Autoren in hnRNP - Proteinen beschrieben wurde (84, 85). Außer in den Spezies C3/C3x ist es in allen Proteinen, inklusive der D - Gruppe, mit etwa 2 - 30 % des Gesamtarginingehalts vorhanden. Bemerkenswert ist vor allem das Vorkommen eines weiteren Dimethylargininisomeren, des symmetrischen N^G, N^G - Dimethylarginins, besonders in der Spezies B1c und geringfügiger in B1a.

Zur Absicherung dieser Befunde, sowie zum Test auf weitere posttranslationale Methylierungen wurden (3H -methyl) - Methionin markierte RNP - Protein - Fraktionen der Aminosäureanalyse unterzogen. Die in den eluierten Fraktionen inkorporierte Radioaktivität ergab das in Abb.11 b,c) aufgezeigte Profil. Man erkennt deutlich die Maxima an den Elutionspunkten von Methionin und N^G, N^G -Dimethyl - arginin. Wesentlich geringere Mengen an Radioaktivität sind in Monomethylarginin und das symmetrische Dimethylargininisomere inkorporiert. Letzteres präsentiert sich als "Schulter" im N^G, N^G -Dimethylarginin - Maximum. Weitere methylierte Spezies, insbesondere methylierte Lysin- und Histidinreste wie in Histonen (80), konnten nicht festgestellt werden.

Vergleicht man die spezifische Radioaktivität von Methionin und Dimethylarginin, so stellt man fest, daß die spezifischen Radioaktivitäten nach 24 h Markierung gleich

Tabelle 2:

Aminosäurezusammensetzung der hnRNP - Proteine aus HeLa - Zellen
(Angaben in mol% (=nmol/100 nmol))

	A1	A1x	A2	A2s	E1a	B1b	B1c	B2	C1	C2	C2s	C3	C3x	D1 ^a	D2 ^a	D3 ^a	D4 ^c
Asp D	10.9	10.5	10.5	10.6	10.4	10.2	11.5	10.2	9.2	9.6	9.2	15.9	14.5	9.7	9.2	8.7	10.9
Thr I	3.9	4.5	3.1	3.3	3.6	3.5	4.0	3.2	3.2	4.1	4.1	2.2	2.7	4.2	4.3	4.7	3.3
Ser S	9.8	10.1	6.8	6.7	6.7	7.1	5.4	8.1	6.7	5.6	6.1	9.2	9.9	7.8	7.8	8.2	13.6
Glu F	9.5	9.4	9.7	9.1	10.1	10.0	13.2	9.4	9.3	12.5	12.6	17.1	13.4	13.0	13.5	13.2	6.7
Pro F	2.7	3.2	4.0	7.9	4.2	3.2	3	4.0	3.7	4.9	4.5	3.1	3.8	5.1	4.3	2.3	7.6
Gly B	19.9	19.2	24.7	25.4	22.3	23.6	18.3	23.8	26.3	19.2	19.0	9.2	9.8	18.0	17.2	18.8	19.0
Ala A	4.2	4.5	4.2	4.3	4.0	5.0	5.5	5.1	5.8	7.1	7.1	7.7	7.9	8.2	8.3	7.8	4.9
Val V	5.6	5.4	4.7	4.5	4.7	4.7	3.8	4.5	4.7	5.0	5.8	7.1	7.1	4.4	4.6	4.7	3.3
Cys C	0.2	n.d.	0.3	n.d.	a	a	a	a	1.7	0.9	n.d.	0.3	a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Met M	1.5	1.4	1.7	1.8	1.7	1.5	1.5	1.5	1.7	1.5	1.5	1.7	1.6	1.7	1.5	1.6	1.3
Ile I	2.7	2.7	2.7	2.7	2.6	2.9	3.7	2.3	2.0	3.2	3.8	3.4	3.3	2.9	3.1	3.1	1.8
Leu L	3.4	2.8	3.0	3.0	3.5	5.7	4.6	3.0	2.8	3.6	5.4	5.2	5.9	4.0	3.7	5.0	4.2
Tyr Y	4.0	3.8	6.1	5.7	5.8	4.7	7.2	5.3	5.4	5.7	5.1	2.7	2.8	4.8	4.9	5.2	5.7
Phe F	6.4	6.2	5.4	5.5	5.5	4.7	4.0	5.2	4.9	3.3	3.0	2.4	2.2	3.4	3.7	3.5	1.9
Trp W	+	+	+	+	+	+	+	+	a	+	+	+	-a	+	+	+	+
Lys I	5.5	5.7	4.5	4.6	5.8	5.3	6.9	4.8	5.5	7.5	7.5	9.6	8.7	7.6	7.4	6.8	3.6
His H	2.5	2.5	1.8	2.0	2.0	1.8	1.3	1.9	1.9	1.3	1.4	0.6	0.7	1.2	1.5	1.2	1.0
Asn R	1.1	1.1	0.1	0.1	-b	0.6	1.5	0.4	1.4	0.3	0.1	a	a	0.6	-b	0.8	1.3
Gln R							0.2										
Arg R	6.1	6.2	6.7	6.4	10.7 ^b	5.3	3.7	6.9	5.5	4.0	3.7	5.6	5.4	3.4	4.3 ^b	4.5	9.7

a) unter Nachweisgrenze

b) Summe aus Met und Arg ist konstant

c) Bestimmung durch 24 h Hydrolysezeit

+: vorhanden

n.d.: nicht bestimmt

sind (1680 : 1800 dpm/nmol $-CH_3$), während bei 4 h Markierung das Einbauverhältnis von Dimethylarginin : Methionin auf 1:2 sinkt (700 : 1200 dpm/nmol $-CH_3$). Daraus kann geschlossen werden, daß es sich bei der Methylierung des Arginins um einen relativ zur Generationszeit schnell ablaufenden Vorgang handelt.

Es wurde berichtet, daß die Methylase I, die bei Histonen für die Methylierung des Arginins verantwortlich ist, proliferationsabhängig arbeitet (86, 87, 88). Ob die "Core"-Proteine als Substrat für die Methylase I dienen, und ob daher diese Befunde auf "Core" - Protein Methylierungen ausgedehnt werden können, ist ungewiß; allerdings zeigen Untersuchungen bei Lymphocyten, daß die Methylierung nach ConA - Stimulation mit erhöhter Effizienz abläuft (67, 80). Dies weist in der Tat auf eine Abhängigkeit der Methylierung von der Proliferation der Zellen hin.

Tabelle 3:

Differenzindizes (DI) der hnRNP-Proteine

	A1	A2	B1a	B1b	B1c	B2	C1	C2	C3	C3x	D1	D2	D3	D4
A1	0	8.6	8.4	7.9	13.1	7.5	9.8	13.3	20.2	20.2	13.5	13.8	12.5	16.1
A2		0	5.2	5.2	12.8	3.2	3.7	13.6	25.6	25.6	14.6	13.6	14.6	17.0
B1a			0	6.7	12.6	6.1	6.8	11.9	25.7	23.7	14.0	13.9	14.1	14.7
B1b				0	10.3	4.6	6.3	10.9	21.3	20.7	11.9	12.0	10.3	16.9
B1c					0	13.3	14.6	6.9	17.5	17.0	8.3	8.4	7.9	18.7
B2						0	4.4	12.7	24.4	22.3	13.4	13.0	12.9	15.1
C1							0	13.3	26.8	25.9	15.7	14.8	14.5	18.6
C2								0	18.4	17.1	4.2	4.3	6.4	18.6
C3									0	3.4	16.3	16.4	15.7	20.6
C3x										0	14.8	14.1	15.0	16.0
D1											0	2.4	5.1	16.7
D2												0	4.8	20.3
D3													0	19.4
D4														0

$$DI (A1/A1x) = 2.3$$

$$DI (A2/A2s) = 1.6$$

$$DI (C2/C2s) = 3.7$$

4.5.1 Der DI: Vergleichende Betrachtungen

Betrachtet man die Aminosäurezusammensetzungen der 16 isolierten Proteine näher, erkennt man in verschiedenen Gruppierungen interessante Ähnlichkeiten. So ist die Gruppe der basischen "Core" - Proteine A1, A2, B1a, B1b, B2 und C1 sich untereinander sehr ähnlich; desgleichen die Proteine C3/C3x und die Proteine D1 bis D3 aus der D - Gruppe. Außerdem scheinen sich die Spezies B1c und C2 zu ähneln.

Zur Quantifizierung dieser Betrachtungen wurde der sog. "Difference Index (DI)" zwischen jedem Proteinpaaar bestimmt (Tabelle 3). Dieser DI wurde von Metzger et al. (89) als Maß für die Verschiedenheit zweier Proteine bezüglich ihrer Primärstruktur aus den Aminosäurezusammensetzungen bestimmt. Er berechnet sich zu:

$$DI = 50 \times \sum |n_A/N_A - n_B/N_B| = 2 \times \sum |x_A - x_B|$$

mit: $n_{A,B}$ = Zahl der Reste jeder Aminosäure pro Protein

$N_{A,B}$ = Gesamtzahl der Aminosäuren pro Protein

$x_{A,B}$ = mol% der einzelnen Aminosäuren im Protein

Dies ergibt einen DI von 100 bei Vergleich von z.B. Polylysin mit Polyalanin und einen DI von 0 bei Proteinen identischer Aminosäurezusammensetzung. Cornish - Bowden zeigte, daß für Proteine im M_r -Bereich von 25 - 50000 ein DI zwischen 6 und 10 als starker Hinweis auf eine Verwandtschaft zweier Proteine gelten kann (91). Vergleichende Betrachtungen von 68 durchschnittlichen Proteinen ergaben das Histogramm aus DI - Werten in Abb.12 a) (89, 90). Man erkennt eine Gauss'sche Verteilung der Zahl der Proteinpaaare mit bestimmtem DI um den Wert $DI = 24$.

Trägt man die Paare bestimmter DI - Werte für die 16 hnRNP - Proteine auf, erhält man das Profil in Abb.12 c).

Zum weiteren Vergleich ist das Histogramm der DI - Werte von Cytochrom C verschiedener Spezies gezeigt (Abb.12 b)).

Eine nähere Analyse der Daten zeigt, daß die Gruppe der basischen "Core" - Proteine und der Proteine D1 - D3 den linken Teil des Histogramm in Abb.12 c) ausmachen, während die DI - Werte zwischen 9 und 18 von Vergleichen der

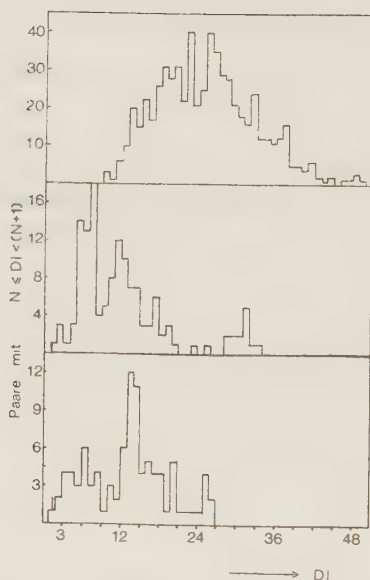


Abb.12:

Histogramme der DI - Verteilung verschiedener Proteinpaae. Die Zahl der Paare gleicher DI - Werte sind als Funktion der DI - Werte aufgetragen.

a) 68 durchschnittliche Proteine (90)

b) Cytochrom C - Vergleiche verschiedener Spezies (90)

c) DI - Werte der 16 untersuchten hnRNP - Proteine. Die Werte für Tryptophan und Cysteinsäure wurden nicht berücksichtigt.

D - Proteine mit den basischen Spezies kommen. Die hohen DI - Werte ergeben sich aus den Vergleichen von C3/C3x mit allen anderen Proteinen.

Daraus lassen sich folgende vorläufige Schlüsse ziehen: Die Gruppe der basischen unterscheidet sich stark von der Gruppe der sauren "Core" - Proteine. Es besteht wahrscheinlich kein Verwandtschaftsverhältnis. Die basischen Proteine untereinander, sowie die neutralen D - Proteine haben DI - Werte, die stark auf enge Verwandtschaft hindeuten. Zum Teil sind sie sich ähnlicher als Cytochrom C Proteine verschiedener Spezies, die auf Grund ihrer zentralen Rolle

in der Atmungskette sehr konservativ sind. Über die Verwandtschaft der "Core" - Proteine zu den D - Proteinen ist keine Aussage möglich, da die relativ großen Unterschiede in den Molekulargewichten die Interpretation der DI - Werte verbieten. Zu erwähnen bleibt die Beziehung B1c/C2, deren DI auf enge Verwandtschaft hindeutet. Dies wird unterstützt durch ein nahezu identisches Laufverhalten bei Elektrophorese unter 8M Harnstoff. In diesem Zusammenhang sei auch auf die sehr niedrigen DI - Werte verwiesen, die die Vergleiche dieser beiden Spezies mit den neutralen D - Proteinen ergeben.

Einschränkend muß zum Abschluß erwähnt werden, daß DI - Werte allein keine endgültige Beweiskraft haben und nur als Hinweise auf mögliche Verwandtschaftsbeziehungen gelten dürfen.

4.6 in vitro - Rekonstitution von 35S-RNP-Komplexen

Als Funktion für die "Core"-Proteine wurde das Verpacken der entstehenden hnRNA vorgeschlagen (25). Die enzymatischen Prozesse der hnRNA - Reifung bleiben dieser Hypothese nach den lose assoziierten meist höhermolekularen Proteinen der Partikel vorbehalten (25, 29). Aus dieser Annahme muß folgen, daß die hnRNP - "Core" - Proteine keine Spezifität bezüglich der RNA - Sequenz haben kann, da die gebundene RNA eine sehr heterogene Population ist.

Basierend auf dieser Arbeitshypothese wurde ein *in vitro*-Rekonstitutionssystem entwickelt. Dabei wird die endogene RNA isolierter hnRNP - Partikel durch Staphylococcus Nuclease verdaut, und nach Inaktivierung der Nuclease mit EGTA (Komplexierung von Ca^{2+}) wird eine exogene RNA freier Wahl zugegeben. Durch Inkubation bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln wird die Rekonstitution eines Komplexes erreicht, der sich in S-Wert und Stöchiometrie auf eindimensionalen Gelen wie ein natives hnRNP - Partikel verhält (s. Abb. 13 a,b,d,e)

Während der Verdauung mit Staphylococcus Nuclease entsteht eine Trübung, die lt. Gelelektrophorese die ausgefallenen Proteine des 40S - Bereichs repräsentiert. Nach Zugabe der exogenen RNA bildet sich die Trübung weitgehend zurück. Die freien Proteine tendieren also anscheinend in Abwesenheit einer RNA zur Aggregation. Dieser Vorgang bleibt nur in genügend verdünnten Lösungen ($<0,1$ mg/ml) aus.

Als exogene RNA-Spezies wurde in den meisten Fällen die RNA des Bakteriophagen MS 2 verwendet. Diese RNA (3569 N (92)) wurde ausgewählt, weil sie keine der posttranscriptionalen Modifikationen eukaryotischer hnRNA, wie 5'-Kappe, 3'-Poly(A) oder interne Methylierungen enthält und keine Introns hat. Sie besitzt allerdings eine komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur. Damit ähnelt sie eukaryotischer hnRNA oder mRNA genügend, ohne eventuelle Signalstrukturen oder -sequenzen zu besitzen, die eine Interpretation erschweren. Verfolgt man das Bindungsverhalten der "Core" - Proteine an steigende Mengen MS 2 - RNA, ist erkennbar, daß die sich gewohnte Stöchiometrie bei geringen MS 2 - RNA Mengen zugunsten der Spezies C1 bzw. C3 und A2 verschiebt (Abb. 13

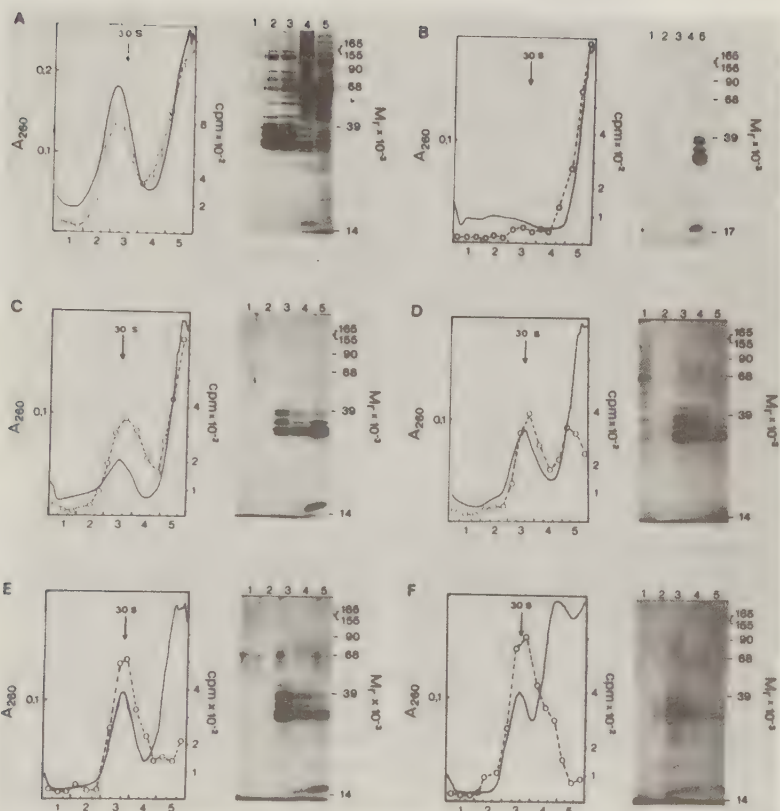


Abb.13:

Rekonstitution von "Core" - Proteinen mit MS 2 RNA. 40S - Fraktionen von nativen nucleären Extrakten (jeweils 250 µg Protein) wurden wie beschrieben mit Staphylococcus Nuclease verdaut und nach EGTA - Zugabe mit MS 2 RNA rekonstituiert. Die Ansätze wurden auf 15-30% igen Sucrosegradienten analysiert. Die Gradienten wurden fraktioniert und auf Laemmli - Gelen aufgetrennt. Die Proteinanteile des Ausgangsmaterials waren mit geringen Mengen (^3H -methyl)-Methionin markiert. (o-o). Die Radioaktivität wurde nach TCA - Fällung bestimmt.

a) Profil eines nativen nucleären Extrakts

b) Rezentrifugation unter identischen Bedingungen nach Nuclease - Verdauung der endogenen RNA.

c) - f) Rekonstitutionsansätze mit verschiedenen Mengen an MS 2 RNA: 10 µg (c), 20 µg (d), 50 µg (e) und 100 µg (f).

c). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die C - Proteine auch die salzstabilste Bindung an die RNA haben, wie durch Dissoziationsexperimente gezeigt wurde (25, 74). Bei weiterer Zugabe von MS 2-RNA bis zu einem Protein : RNA Verhältnis von 4 : 1 lagern sich die "Core" - Proteine fast vollständig an die entstehenden Komplexe an (Abb.13 d,e). Dies entspricht dem für native Partikel bekannten Protein : RNA Verhältnis (s.4.9.5 und (25)). Eine Zugabe von RNA über diese Menge hinaus führt ebenfalls zu einem analogen Partikel. Die überschüssige RNA sedimentiert als breiter Peak bei niedrigerem S-Wert (Abb.13 f). Dies weist auf eine gewisse Kooperativität in der Partikelbildung hin.

4.6.1 Native und rekonstituierte Partikel: Vergleichende Untersuchungen

Die Identität von nativen hnRNP - Partikeln und rekonstituierten 35 S - Komplexen wurde über folgende Analysemethoden nachgewiesen: 1.) 2D - Gelelektrophorese, 2.) Metrizamid - Dichtegradientenzentrifugation und 3.) Elektronenmikroskopie.

Die gelelektrophoretischen Untersuchungen ergaben ein völliges Gleichverhalten beider Partikel. Die 9 Hauptproteine, ebenso wie die 4 Proteine der D-Gruppe sind in gleicher Stöchiometrie vorhanden (Abb.14 b)). Die Menge an höhermolekularen Proteinen ist deutlich reduziert und entspricht etwa der in pelletierten nativen Partikeln (siehe Abb.14 d)).

Metrizamid - Gradientenanalyse zeigt für native, wie rekonstituierte Partikel Bandierung bei Dichten von 1,27 g/cm³ in Wasser und 1,33 g/cm³ in D₂O. Diesen Gradienten wurde vor Hochsalzdichtegradienten, wie CsCl oder Cs₂SO₄ der Vorrang gegeben, da durch das nichtionische Metrizamid die interne Struktur der Partikel inklusive ihrer Hydrathülle erhalten bleibt. Dies muß für Cs₂SO₄- oder gar CsCl-Gradienten - bei letzteren muß zusätzlich durch Formaldehyd oder Glutaraldehyd fixiert werden - bezweifelt werden. Die gemessenen Werte entsprechen Ergebnissen aus anderen Laboratorien (65). Freie "Core" - Proteine nach RNAase - Verdauung bandieren unter D₂O - Bedingungen im Bereich von

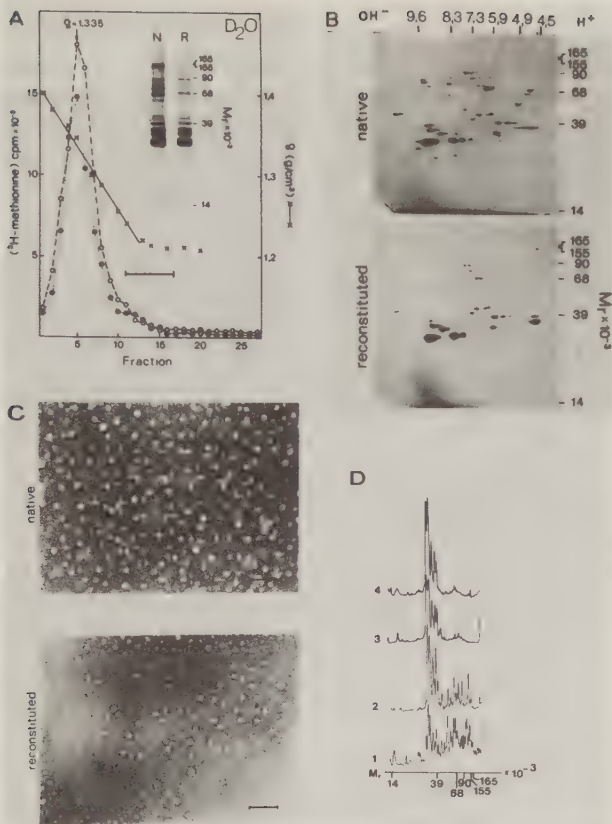


Abb. 14:

Vergleichende Analysen von nativen und rekonstituierten RNP - Partikeln.

(A) Metrizamid Gradientenzentrifugation: Native und rekonstituierte RNP - Komplexe aus 30-40S - Regionen von Sucrosegradienten wurden wie beschrieben auf Metrizamid - Stufengradienten zentrifugiert. Gezeigt sind die Profile von säureunlöslicher Radioaktivität (^3H -methyl)-Methionin) aus nativen (○--○) und rekonstituierten (●--●) Partikeln. Die Peak - Fraktionen wurden auf Laemmli - Gelen analysiert (N: nativ; R: rekonstituiert). Die Bandierung freier Proteine ist durch den Balken im Bereich von 1,20 - 1,23 g/cm^3 (>80% der Gesamtradioaktivität) angezeigt. (B) 2D - Gel Analyse: Native und rekonstituierte Partikel aus 30-40S Regionen von Sucrosegradienten wurden im NEPHGE - System (51) gelelektrophoretisch aufgetrennt. (C) Elektronen - Mikroskopie: Partikel der entsprechenden Gradientenfraktionen wurden in PBS verdünnt und mit Phosphorwolframsäure negativ kontrastiert. Die Bilder wurden in 24000 facher Vergrößerung aufgenommen. Der Balken entspricht 100 nm. (D) A_{260} - Scans von Laemmli - Gelen: 20 S Bereich eines Sucrosegradienten (1); native 40S Partikel (2); native pelletierte Partikel (3); rekonstituierte 35S Partikel (4).

1,2 - 1,23 g/cm³.

Elektronenmikroskopie, durchgeführt durch Negativ - Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure oder Uranylacetat, zeigt für beide Spezies kreisförmige Strukturen mit Durchmessern zwischen 15 und 25 nm. Die Größenverteilung ist für native und rekonstituierte Partikel identisch.

4.6.2 Rekonstitutionen mit verschiedenen Polynucleotiden

Zur Feststellung der Mindestanforderungen an die Polynucleotide bezüglich Sequenz und Topologie wurden Rekonstitutionen mit Homopolymeren wie Polyadenylsäure und Polyuridylsäure, partiellen Doppelsträngen wie dem statistischen Copolymer Poly(A,U) und echten Doppelsträngen wie Poly(A)*Poly(U) durchgeführt. Die verwendeten Substanzen hatten Größen von 8 - 12S (bzw. 600 - 1200 N Länge).

Alle Homopolymeren zeigten völlig normale 35S - RNP Bildung. Es konnte kein Unterschied zwischen Polypurinen und Polypyrimidinen festgestellt werden (Abb.15 a,c). Dies bekräftigt die zugrundeliegende Hypothese, daß die "Core" - Proteine keine Spezifität für bestimmte RNA - Sequenzen haben.

Der Einfluß von Sekundärstruktur wurde mit Hilfe des statistischen Copolymers Poly(A,U) und des reinen Doppelstrangs Poly(A)*Poly(U) überprüft. Die Bildung eines 35 S - RNP Partikels kann nur für das Poly(A,U) - Copolymer beobachtet werden (Abb.15 b,d)), das einen hohen Anteil an interner Selbstkomplementarität enthält und daher Sekundärstrukturelemente wie Schleifen und Doppelstrangbereiche ausbildet. Man kann eine Struktur erwarten, die in gewisser Weise der der MS 2 - RNA entspricht, welche ebenfalls einen hohen Anteil an Sekundärstruktur aufweist. Für den regulären Doppelstrang Poly(A)*Poly(U) entsteht kein Partikel. Dies legt den Schluß nahe, daß rein doppelsträngige Nucleinsäuren kein Substrat für die "Core" - Proteine sind. *In vivo* ist der Ausschluß doppelsträngiger Regionen aus hnRNP - Komplexen ebenfalls beobachtet worden (93).

Eine Erweiterung dieser Rekonstitutionsexperimente auf DNA zeigt, daß diese Daten auf Desoxyribonucleinsäuren übertragbar sind. Rekonstitutionsansätze mit DNA -

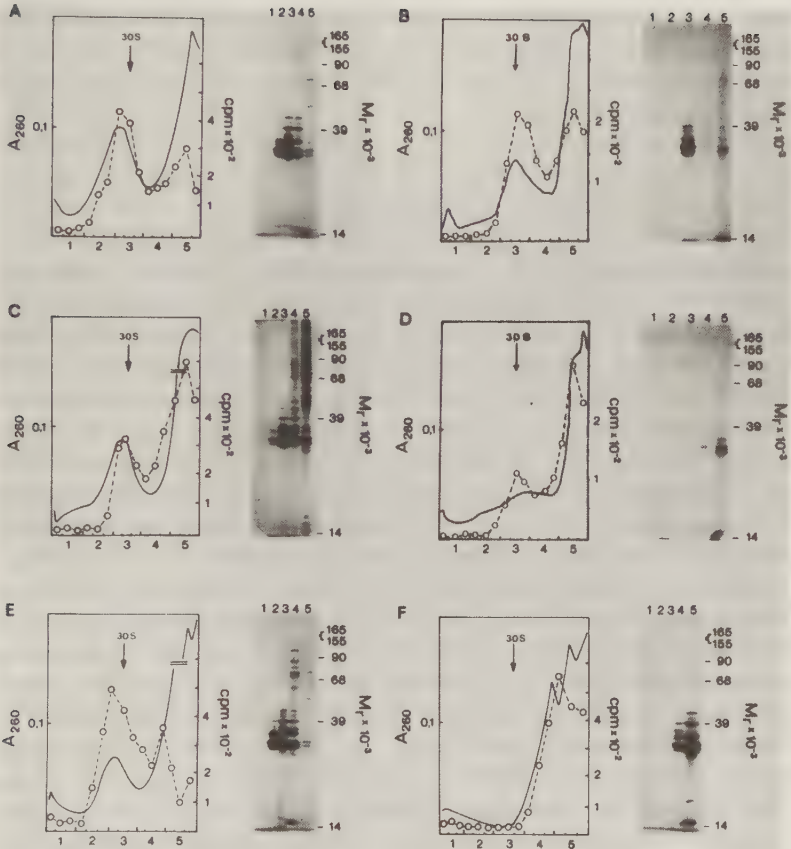


Abb. 15:

Rekonstitution mit verschiedenen Nucleinsäuren: Durchführung und Analyse sind analog den vorherigen Experimenten. (—) = A_{260} ; (o-o) = TCA - fällbare Radioaktivität der hnRNP - Proteine. Die folgenden Ansätze wurden verwendet: (A) 400 µg 40 S hnRNP - Protein mit 100 µg poly(U); (B) 200 µg 40 S RNP - Protein mit 50 µg poly(A,U); (C) 800 µg nucleärer Extrakt mit 100 µg poly(A); (D) 200 µg 40 S RNP - Protein mit 50 µg poly(A)*poly(U); (E) 400 µg 40 S RNP - Protein mit 10 µg hitzedenaturierter Maus - DNA (400 - 800 N); (F) 400 µg 40 S RNP - Protein mit 100 µg native Maus - DNA (400 - 800 bp). Die Sedimentationswerte der freien Oligonucleotide sind mit Pfeilspitzen markiert (8 - 12 S).

Fragmenten aus Di- bis Tetranucleosomen (isoliert aus Kernen einer Maus - Zelllinie) zeigen die Bildung eines 35 S - Partikels, wenn hitzedenaturierte DNA eingesetzt wird. Native undenaturierte DNA - Fragmente erlauben keine Partikelbildung (Abb.15 e,f)). Das Vorhandensein einer 2'-OH - Gruppe ist also keine zwingende Voraussetzung für die Bildung eines Partikels.

4.6.3 Rekonstitution oligomerer RNP-Komplexe

Berücksichtigt man die Länge der Phagen - RNA MS 2 (3568 N), sollte sich auf dieser Nucleinsäure ein oligomerer RNP - Komplex bilden können. Legt man die beschriebenen Längen der aus hnRNP - Partikeln isolierten RNA - Fragmente zugrunde (ca. 200 - 1500 N (25, 94)), so ist ein trimerer bis tetramerer Komplex zu erwarten. Ein solcher Komplex sollte einen S - Wert zwischen 55 - 70 S besitzen, also auf einem 15 - 30 %igen Sucrosegradienten noch nicht pelletiert sein. Es wurde unter normalen Rekonstitutionsbedingungen jedoch niemals die Bildung einer solchen Struktur beobachtet. Analysiert man die in den rekonstituierten Partikeln enthaltene RNA, ist der Grund offensichtlich: die RNA bandiert als breite Region zwischen 400 und 800 Nucleotiden Länge. Diese Fragmente erlauben die Bildung monomerer RNP - Komplexe, jedoch keine Dimeren oder höhere Strukturen. Zwei Faktoren lassen sich für die RNA - Degradation verantwortlich machen: zum einen eine endogene nucleolytische Aktivität, wie sie bereits für hnRNP - Präparationen aus Rattenleber beschrieben ist (23); zum anderen enthalten alle kommerziell erhältlichen *Staphylococcus Aureus* Nucleasen eine kontaminierende Nuclease - Aktivität, die nicht mit EGTA oder pTp (95) inhibierbar ist. Beide Aktivitäten wurden durch Coinkubationsexperimente mit MS 2 nachgewiesen.

Für die bisher beschriebenen Experimente kann die Existenz solcher Nucleasen ignoriert werden; sie fördern im Gegenteil sogar die Freisetzung monomerer 35 S Partikel und erhöhen damit die Ausbeuten. Die Bildung oligomerer Partikel ist allerdings nur möglich, wenn diese Aktivitäten kontrollierbar werden.

Die in der Staphylococcus - Nuclease enthaltene Kontamination lässt sich durch starke Reduktion der eingesetzten Menge ($1/10 - 1/20$), oder durch Rekonstitution in Abwesenheit von Staphylococcus Nuclease kontrollieren. Für den letzteren Fall wurde die Rekonstitution nach Dissoziation der Partikel mit 600 mM NaCl oder 4 bzw. 8M Harnstoff durchgeführt (s. 3.6). Die endogene RNA wurde in einigen Fällen durch DEAE - Cellulose - Chromatographie abgetrennt.

Die Kontrolle der endogenen Spezies ist ungleich schwerer. Inhibitionsexperimente zeigen, daß Vanadylinhibitoren und Heparin als RNAase - Hemmer erfolgreich sind, allerdings im Fall des Vanadyl - Komplexes in Konzentrationen (>1 mM), die die Rekonstitution selbst beeinträchtigen. Für den Einsatz des Polyanions Heparin muß die Rekonstitutionsvorschrift variiert werden, da Heparin selbst eine Affinität zu den "Core" - Proteinen zeigt. Durch Verlängerung der Inkubationszeit (bis zu 2 h) oder Erhöhung der Inkubationstemperatur (1h, 30°C) kann in der Tat ein oligomerer Komplex isoliert werden, der bei 58 - 60 S sedimentiert (Abb.16 a)). Ebenfalls erfolgreich sind Rekonstitutionsansätze mit weiter aufgereinigten hnRNP - "Core" - Proteinen: Nach Pelletierung der nativen Partikel und Resuspension in 15% Sucrose in STM - A führt eine Rekonstitution nach Verdauung mit 10 u/ml (also 4 u absolut) Staphylococcus Nuclease zu einem Komplex, der zwischen 55 und 60 S sedimentiert (Abb.17). Die Stöchiometrie in diesem Peak entspricht der Norm. Interessant ist das Verhalten der Bande bei $M_r = 44000$, die das Protein D repräsentiert. Man erkennt die schon weiter oben erwähnte Zunahme zum höhermolekularen Bereich, die auf eine Affinität dieses Proteins zu oligomeren Komplexen hindeutet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fraktionen des Absorptionsmaximums zeigen die Anwesenheit sowohl monomerer als auch dimerer, trimerer und tetramerer Strukturen.

Zu erwähnen bleiben ferner die Rekonstitutionen mit ribosomaler RNA aus HeLa Zellen. Wie aus den vorhergehenden Experimenten zu erwarten, sind diese auch Substrate für die Verpackung durch "Core" - Proteine. Der bei einem Ansatz mit 28 S rRNA gebildete Komplex sedimentierte bei etwa 65 - 70 S (Abb.16). Dieser hohe Wert erklärt sich durch die Größe der

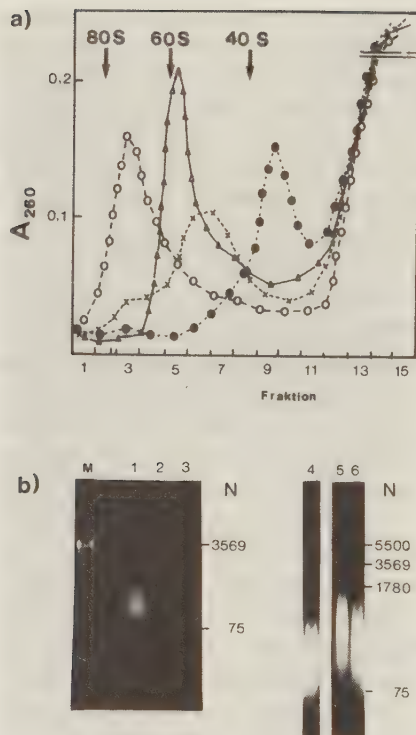


Abb. 16

a) Vergleichende Gradientenprofile verschiedener Rekonstitutionsansätze: Die Rekonstitutionen mit 18 S rRNA (x--x), 28 S rRNA (o--o) und MS2 RNA (●--●) wurden nach der beschriebenen Standardmethode durchgeführt (s.3.6). Die Rekonstitution in Gegenwart von 0,1 mg/ml Heparin (Δ--Δ) ist im Text näher beschrieben. Die Ansätze mit polyA(+)-RNA zeigen ein völlig identisches Verhalten wie die Standard Rekonstitution mit MS 2 RNA (o--o), die Rekonstitution nach Dialyse aus 4M Harnstoff ohne Zugabe von exogener Nuclease ist identisch mit der 18 S - Rekonstitution (x--x). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden diese Kurven weggelassen. Standardisiert wurde mit EDTA - behandelten Ribosomen aus HeLa - Zellen.

b) Analyse der RNA - Komponenten verschiedener RNP - Komplexe: Die entsprechenden Fraktionen der Sucrosegradienten wurden mit 10 µg/ml Proteinase K verdaut, phenolisiert und nach Ethanolpräzipitation auf Agarosegelen wie in 3.7.1 beschrieben aufgetrennt. Die einzelnen Spuren enthalten: RNA aus -1- Rekonstitutionen mit MS 2 RNA, -2- RNP - Partikeln nach Rekonstitution und Dialyse, -3- 55 S Maxima von Heparin Rekonstitutionen, -4- nativen 40 S Partikeln, -5- 65 S Maxima von 28 S rRNA Rekonstitutionen und -6- 45 S Maxima von 18 S Rekonstitutionen. Als Größenstandards dienten 28 S rRNA (5500 N), MS 2 RNA (3569 N), 18 S rRNA (1780 N) und tRNA (etwa 75 N).

RNA (HeLa S3 - 28 S rRNA: ca. 5500 N). Der intakte oligomere Komplex bei einem Standard - Rekonstitutionsansatz (s.3.6) ist am einfachsten erklärbar durch die bekannte relative Stabilität ribosomaler RNA gegen Nucleasen, die durch eine hohe Zahl interner 2'-O-Methylierungen verursacht wird. In Extrapolation der Ergebnisse an MS 2 RNA (3569 N) ist maximal die Bildung eines Hexameren zu erwarten, dessen S - Wert zwischen 65 und 75 S zu erwarten ist.

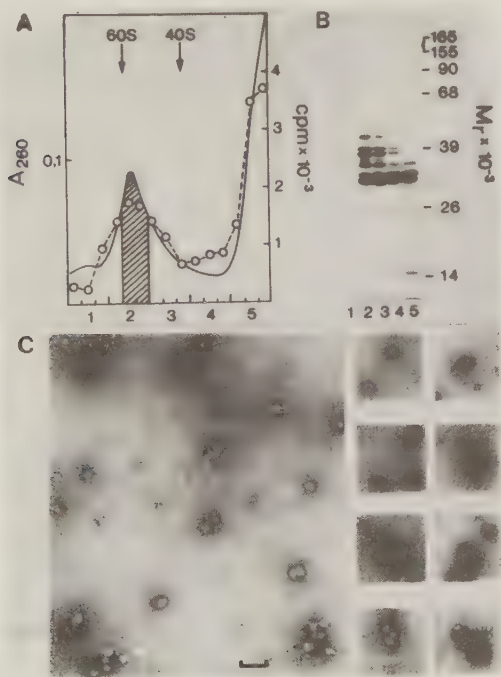


Abb. 17:

Rekonstitution von oligomeren RNP - Komplexen mit MS 2 RNA: 0,1 mg MS 2 RNA wurden mit 0,5 mg pelletiertem RNP - Protein rekonstituiert wie im Text und in 3.7 beschrieben.

A) Sedimentationsprofil (A_{260} : — ; cpm: o--o) des rekonstituierten Komplexes.

B) Proteinanalyse der Gradientenfaktionen. Jeweils drei Fraktionen wurden vereinigt und auf 10 %igen SDS - PAA Gelen aufgetrennt.

C) Elektronenmikroskopie der RNP - Komplexe des 55 S Maximums: Die Komplexe wurden mit Glutaraldehyd fixiert und negativ kontrastiert mit Uranylacetat. Der Balken entspricht 100 nm.

Ein vergleichendes Experiment mit 18 S rRNA (ca. 1800 N) erbrachte einen Komplex mit etwa 45 - 50 S (Abb.16).

Diese Serie von Experimenten impliziert die folgenden S - Werte für die verschiedenen RNP - Komplexe: Monomer - ca.35 S, Dimer 45-50 S, Trimer 50-55 S, Tetramer ca.60 S, Pentamer 60-65 S und Hexamer >65 S. Diese Werte liegen erheblich unter den Werten, die nach der für Polysomen abgeleiteten Beziehung $S_N = S_0 \cdot N^{0.58}$ (97) von Samarina postuliert wurden (21). Man kann daraus auf eine geringere Kompaktheit der Oligomeren als bei Polysomen schließen. Einschränkend muß allerdings angeführt werden, daß S-Wert Bestimmungen aus "linearen" 15 - 30 %igen Sucrosegradienten selbstverständlich nur als Abschätzungen begriffen werden dürfen. Vergleichbare Arbeiten von anderen Gruppen haben jedoch völlig analoge Daten erbracht (19, 96).

Die Länge der eingesetzten Nucleotide und die daraus resultierenden oligomeren Komplexe weisen auf RNA - Stücke von 850 - 1000 Nucleotiden Länge pro Monomer hin. Dies entspricht den bisher indirekt bestimmten Werten anderer Gruppen (21, 25, 30).

Untersuchungen der RNA - Komponenten der verschiedenen oligomeren Strukturen zeigen, daß trotz Inhibitoren in allen Fällen Degradation eingetreten ist (Abb.16 b)). Die Länge der Fragmente ist jedoch bei Anwesenheit von Inhibitoren oder bei rRNA deutlich erhöht. Die Fluoreszenz der RNA - Fragmente reicht in einigen Fällen bis zur Höhe der intakten Spezies (Abb.16 b)). Die Aktivität der endogenen Nuclease kann also durch die üblichen Inhibitoren nicht völlig unterdrückt werden. Einige Inhibitoren wie z.B. RNasin aus Plazenta zeigen überhaupt keine Wirkung.

Der Schluß, der aus diesen Daten gezogen werden kann, ist, daß oligomere RNP - Strukturen keines durchgängigen RNA - Stranges bedürfen, um stabil zu bleiben, sondern daß Fragmente der Größe 800 - 2000 N ausreichen, einen einmal existenten Komplex zu stabilisieren. Nucleaseschnitte bleiben ohne Wirkung auf die Integrität des Oligomeren, solange sie nicht im "linker" - Bereich der RNA stattfinden, der die einzelnen Monomere verknüpft.

Zu diskutieren bleibt, ob die endogene nucleolytische

Aktivität auf Restaktivität des Spleissapparates zurückzuführen ist, dem gewisse Faktoren oder Signalsequenzen zum spezifischen Arbeiten fehlen. Es kann allerdings durch Northern - Blot Analyse der RNA - Fragmente aus nativen 40 S Fraktionen gezeigt werden, daß Hybridisation mit einem Aktin - Klon keine spezifischen Banden ergibt.

Eine vollständige Charakterisierung der Nuclease steht noch aus; es sind jedoch einige Fakten gesammelt: i) Die Nucleaseaktivität ist unabhängig von zweiwertigen Ionen, da sie nicht durch EDTA oder EGTA inhibiert werden kann; ii) sie ist nicht, wie andere RNAsen durch Zn^{2+} oder RNasin inhibierbar; iii) sie hat wahrscheinlich eine Größe zwischen 30000 und 45000 D, da sie in elektroeluierten Proteinen dieses M_r -Bereichs vorhanden ist; und iv) sie scheint cyclisierend zu schneiden, da rRNA als stark O-methylierte Spezies sehr stabil ist und Ribonucleosid - Vanadyl - Komplexe als "Übergangszustandsanaloge (59)" inhibierend wirken. Erste Ergebnisse aus Coinkubationsexperimenten isolierter "Core" - Proteine mit MS 2 - RNA weisen darauf hin, daß keines der "Core" - Proteine selbst Nuclease - Aktivität hat.

4.6.4 Rekonstitution mit aufgereinigten RNP - Proteinen

Die Ausbeute an RNP - Komplexen nimmt bei Rekonstitutionen unter Standardbedingungen ab, je weiter die Partikel aufgereinigt werden. Gleichzeitig nimmt die Größe der isolierbaren Strukturen zu. Es wurde daher untersucht, ob isolierte RNP - Proteine in der Lage sind, ohne Einfluß eventueller Hilfsfaktoren, mit exogener RNA zu einem RNP - Komplex zu rekonstituieren.

Wie Abb.18 zeigt, ist die Rekonstitution mit elektroeluierten hnRNP - Proteinen und MS 2 RNA aus 8M Harnstoff in guter Ausbeute möglich und führt zu Komplexen mit S - Werten um 45-60 S. Das Proteingel zeigt die normale Stöchiometrie der Partikel. Interessant ist der Ausschluß eines einzelnen Proteins von $M_r=36000$ aus dem höhermolekularen Bereich (s.Abb.18 a), Spur 7). Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei diesem Protein um ein miteluiertes Polypeptid gleicher Größe, daß nicht zu den

"Core" - Proteinen gehört.

Bei diesen Experimenten wurde keine exogene Nuclease eingesetzt.

Die Spezies C3/C3x sind unter verschiedenen Isolationsbedingungen (s. Kap. 4.1) oder in Lymphocyten stark unterrepräsentiert (Abb.3, 4, 19). Dies legt den Schluß nahe, daß beide Proteine keine essentiellen Komponenten der hnRNP - Partikel sind. Da sie auf Grund ihrer isoelektrischen Punkte (pI: 4,7) leicht durch DEAE - Chromatographie bei pH 8 abtrennbar sind (s. 3.13), wurden Rekonstitutionsansätze ohne diese Proteine durchgeführt. Diese zeigen, daß ein distinktes Partikel auch in Abwesenheit der Spezies C3/C3x entsteht (Abb.18 b). Daraus kann geschlossen werden, daß die sauren C - Proteine neben dem Protein A1 die zweiten Spezies sind, die eine andere Funktion als die des reinen Verpackungsproteins haben.

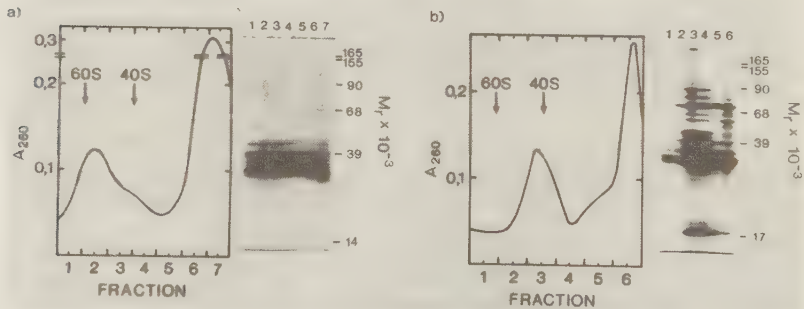


Abb. 18:

Rekonstitutionsexperimente mit weiter aufgereinigten RNP - Proteinen:
a) Proteine des M_r -Bereichs 30 - 45000 wurden aus Laemmli - Gelen ausgeschnitten und elektroeluiert wie in 3.8 beschrieben. Die Proteinlösung (etwa 400 μ g) wurde ethanolgefällt, in 4 M Harnstoff in STM - A Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 100 μ g MS 2 RNA gegen STM - A Puffer dialysiert. Der Ansatz wurde auf den üblichen 15 - 30 %igen Sucrosegradienten analysiert. Jeweils zwei Fraktionen wurden vereinigt und auf Laemmli - Gelen auf ihre Proteinbestandteile untersucht.
b) Material aus 40 S Maxima von Sucrosegradienten wurde bei pH 8 über DEAE - Cellulosechromatographie aufgetrennt wie in 3.14 beschrieben. Der Durchlauf und der 100 mM NaCl Wasch enthielten die basische bzw. neutrale Gruppe der "Core" - Proteine. Sie wurden vereinigt und analog Abb. 18a) rekonstituiert und analysiert.

4.6.5 Rekonstitution mit Lymphocyten RNP - Proteinen

Rekonstitutionsexperimente im Lymphocytensystem führen, wie im HeLa - System, zu einem Partikel, das im Bereich von 35 S sedimentiert. Auf Laemmli - Gelen ist die Stöchiometrie analog dem nativen Partikel, d.h.: wie in Tabelle 1 für Lymphocyten beschrieben. Kein Unterschied - weder in der Ausbeute noch in der Stöchiometrie - ist für ruhende Lymphocyten durch die Reduktion des Proteins A1 zu erkennen (Abb.19). Allerdings sind die Ausbeuten an rekonstituierten Partikeln wesentlich geringer (etwa 10 - 20 %) als die Ausbeuten aus der gleichen Menge HeLa - Extrakt.

Als Ursache für diesen Effekt bietet sich die höhere Ladungsisomerisation der Lymphocyten - RNP Proteine an.

Zum Test auf diese Hypothese wurden auf 2D - Gelen rekonstituierte 40 S Partikel sowie 20 S - Überstände der Rekonstitutionen analysiert. Abb.19 c) zeigt, daß in den 40S Bereichen der Sucrosegradienten die niedrigmodifizierten Ladungsisomeren angereichert sind, während im 20 S Bereich bevorzugt die höhermodifizierten Spezies sedimentieren.

In Abb.19 d) sind diese Ergebnisse durch A_{240} - Scans der verschiedenen Ladungsisomeren quantifiziert.

Dies unterstützt die Theorie, daß die Modifikationen der "Core" - Proteine eine regulatorische Funktion ausübt, nämlich die Inhibition der Assoziation der hnRNA mit den "Core" - Proteinen. Daraus ergeben sich interessante Implikationen, wenn man berücksichtigt, daß das Verhältnis von hnRNA - Abbau zu mRNA - Export in den Kernen ruhender Lymphocyten erheblich größer ist als in stimulierten Zellen (98).

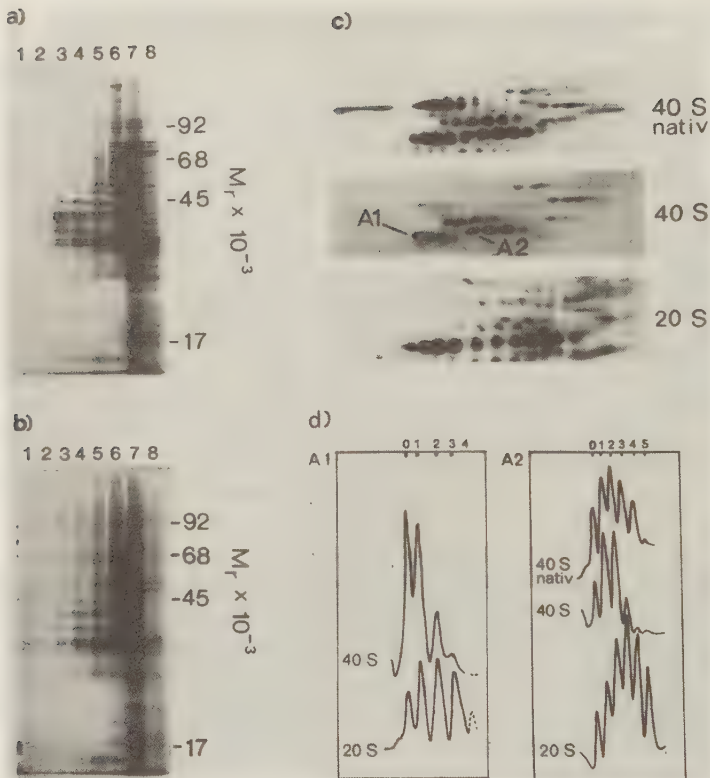


Abb. 19:

Rekonstitutionsexperimente mit Lymphocyten - RNP - Proteinen: Die Durchführung entsprach der Standardrekonstitution.

a,b) Proteingele der Gradientenfractionen von Rekonstitutionsansätzen mit MS 2 RNA und nucleären Extrakten von stimulierten (a) und unstimulierten (b) Lymphocyten. Die Spuren 3 bis 5 repräsentieren den 40 S Bereich; Spur 1 entspricht den Boden des Gradienten.

c) Zweidimensionale Auftrennung von nativen und rekonstituierten RNP - haltigen Fractionen. Gezeigt ist ein Ausschnitt vom M_r -Bereich 25 - 50000. Die Bezeichnungen 20S und 40S beziehen sich auf die entsprechenden Sucrosegradientenfractionen eines Rekonstitutionsansatzes aus stimulierten Lymphocyten. Zum Vergleich ist ein Proteinmuster eines nativen 40 S Maximums gezeigt.

d) A_{540} - Scans der Satellitenflecken der Proteine A1 und A2. Die Bezeichnungen der Maxima 0,1,2,... bezeichnen jeweils den Mutterfleck und den ersten, zweiten und dritten u.s.w. Satelliten. Die Bezeichnungen an den Kurven entsprechen denen in Abb. 19 c). Zur Durchführung: 2D-Gele der entsprechenden Fractionen wurden photographiert und in geeigneter Vergrößerung auf Diafilm abgezogen. Die Wellenlänge von 540 nm zeigte ein optimales Absorptions - Hintergrund Verhältnis.

4.7 RNA - Protein Kontakte im RNP - Partikel

Zur Beschreibung der inneren Struktur der RNP - Partikel wurden Quervernetzungsexperimente von Protein - und Nucleinsäurekomponenten mittels UV - Strahlung durchgeführt. Die Fähigkeit von Nucleinsäuren unter UV - Einfluß von 254nm Wellenlänge kovalent an Proteine zu binden, ist wiederholt beschrieben worden (z.B. 99, 100). Es ist gezeigt worden, daß es sich bei den entstehenden Photoprodukten primär um Uracil - Aminosäure Addukte handelt. Dabei reagieren im Protein hauptsächlich freie Aminogruppen - also primär Lysinreste - mit der Nucleinsäure (101). Abweichend von vergleichbaren publizierten Daten wurden diese Experimente nicht mit ganzen Zellen (99, 101, 102) oder Kernen (103) durchgeführt, sondern im nucleären Extrakt (s. 3.3). Dies bietet den Vorteil, daß ein direkter Vergleich mit rekonstituierten Partikeln möglich ist. Außerdem wird geklärt, ob die isolierten 35 - 40 S Partikel die gleichen RNA - Protein Kontakte haben wie *in vivo*.

Die Optimierung des Systems bezüglich Probenkonzentration, Bestrahlungszeit, Spezifität der Bindung und Zerstrahlung des Proteins ergab folgende günstige Bedingungen: Bestrahlungszeiten von 30 - 60 sec in Proteinkonzentrationen von 0,7 mg/ml (= 0,17 mg/ml RNA) ergeben gute Ausbeuten an RNAase - stabiler, an Proteine fixierter Radioaktivität. Die Intaktheit der Proteine wurde auf Laemmli - Gelen überprüft. Die negative Kontrolle mit BSA und radioaktiv markierter poly(A+) - RNA zeigte unter diesen Bedingungen keine nennenswerte Fixierung von Radioaktivität (Abb.20 a,b,c).

Unter den beschriebenen Bedingungen sieht man für native und rekonstituierte RNP - Strukturen bevorzugt die Banden der C-Proteine markiert (C1/C3 bzw. C2/C3x). Schwach zu erkennen sind die Banden A1 und A2. Genauere Analyse durch Gradientenzentrifugation des Betrahlungsansatzes zeigt, daß die kovalent gebundene Radioaktivität sich zu mehr als 80% im 40 S - Bereich befindet und dort besonders stark an die Proteine der C - Gruppe gebunden ist (Abb.20 d,e,f). Mitmarkiert, allerdings in geringerer Menge, sind die anderen "Core" - Proteine.

Dies weist auf intensive Kontakte zwischen C1 bzw. C3 und C2

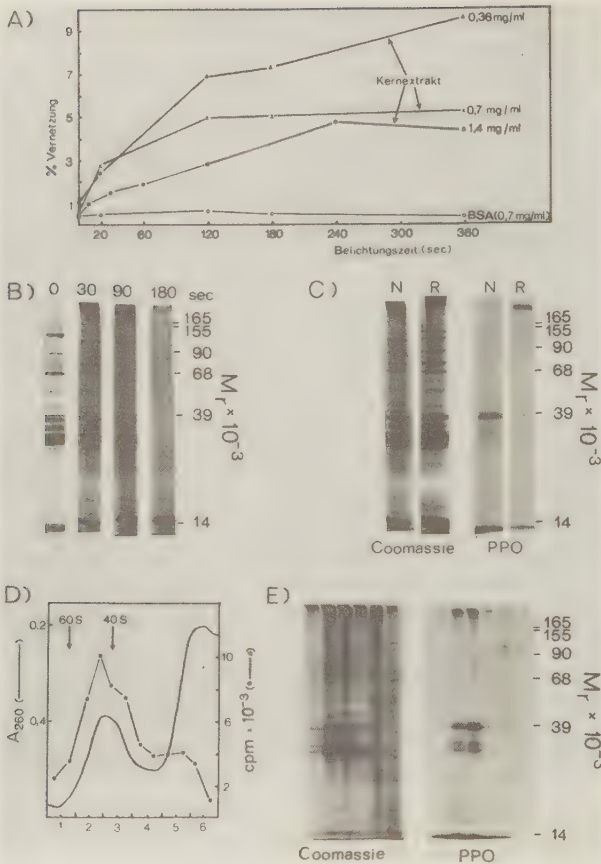


Abb. 20:

UV - Quervernetzungs experimente mit RNP - Komplexen:

A) Optimierung der Bestrahlung bezüglich Bestrahlungszeit und Probenkonzentration; die einzelnen Kurven sind in der Zeichnung näher beschrieben. Die Durchführung erfolgte wie in 3.14 beschrieben.

B) Schädigung der Proteine in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit; Aliquots von 100 μ g wurden nach den jeweiligen Zeiten entnommen und auf Laemmli - Gelen aufgetrennt.

C) Vergleich der kovalent mit Radioaktivität vernetzten Proteine aus RNP - Proben nativer (N) und rekonstituierter (R) Proben. Die entsprechenden Proben wurden nach RNAase Verdauung auf Laemmli - Gelen aufgetrennt und nach Anfärbung mit Coomassie Blau fluorographiert.

D) UV - bestrahlte nucleäre Extrakte wurden auf 15 - 30 %igen Sucrosegradienten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden einer ausgiebigen RNAase - Verdauung unterworfen. Aliquots wurden zur Bestimmung von kovalent gebundener Radioaktivität TCA - gefällt (●-●).

E) Die Fraktionen des Sucrosegradienten (s.D) wurden auf Laemmli - Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt und fluorographiert.

bzw. C3x und der RNA hin, während die anderen "Core" - Proteine wenig oder losen Kontakt zur RNA haben. Die genaue Identifizierung der C - Proteine ist nicht möglich, da zweidimensionale Gelelektrophorese mit quervernetzten Protein/RNA Komplexen im pH - Gradienten der ersten Dimension aufgrund der kovalent gebundenen RNA - Fragmente und teilweiser Zerstörung der Proteine keine interpretierbare Auftrennung ermöglicht. Coinkubationsexperimente von MS 2 - RNA mit elektroeluierten Proteinen C3/C3x zeigen jedoch eine hohe Affinität dieser beiden Spezies zu RNA (104), so daß die beiden sauren C - Proteine die wahrscheinlichsten Kandidaten für die Quervernetzung sind. Die intensive Bindung zweier Proteine im M_r - Bereich 40000 - 44000 an hnRNA ist bereits von van Eekelen et al. (99, 102) beschrieben worden. Diese Gruppe isolierte die beiden Proteine aus nucleärer Matrix. Hier bietet sich eine Spekulation über die in 4.6.4 angesprochene Funktion der sauren C - Proteine an, die darauf hinausläuft, daß die Proteine C3/C3x die RNP - Strukturen während der Prozessierung an der nucleären Matrix fixieren (s. auch Kap.5). Im ganzen stimmen die Daten sehr gut mit den von Economidis und Pederson publizierten Ergebnissen über hnRNA/Protein Kontakte in *in vivo* bestrahlten Zellen überein. Dies kann als weiterer Hinweis dienen, daß die durch die Samarina - Diffusionsmethode gewonnenen, sowie die rekonstituierten RNP- Partikel identisch mit *in vivo* vorkommenden Strukturen sind.

4.8 Wechselwirkung von hnRNP - Komplexen mit snRNP-Partikeln

Die Beteiligung der bei etwa 10 - 20 S sedimentierenden snRNP - Partikel am Prozessierungsvorgang ist, wie oben erwähnt, verschiedentlich postuliert worden (14, 32, 35, 36, 40, 105). Neuere Experimente haben gezeigt, daß Antikörper gegen snRNP - Partikel, meist gewonnen aus Seren von Patienten mit Autoimmunkrankheiten (Lupus erythematosus, MCTD u.a. (38, 106)), das Prozessieren einer mRNA - Vorläufers inhibieren. Von uns (68) und anderen (39) ist die Wechselwirkung der beiden Partikelarten bereits durch Dissoziationsexperimente untersucht worden. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *in vitro* Rekonstitutionssystem bietet zusätzlich die Möglichkeit, zu prüfen, welche Komponenten der einzelnen Partikel die Bindung vermitteln. Weiterhin kann überprüft werden, ob die Wechselwirkung der Partikel *in vitro* hergestellt werden kann; ob es sich also um eine inherente Eigenschaft der Partikel handelt.

Dazu wurden angereicherte, mit ^3H -Uridin langzeitmarkierte, snRNP - Fraktionen aus nucleären Extrakten isoliert und jeweils unter verschiedenen Bedingungen mit nativen und rekonstituierten RNP - Partikeln inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert und die jeweiligen Fraktionen durch Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität bzw. durch RNA - Gelelektrophorese analysiert. Abb.21 zeigt ein typisches Ergebnis eines solchen Experiments. Man erkennt, daß die Radioaktivitätsverteilung durch den Gradienten in allen drei Fällen die gleiche ist, d.h. die snRNAs cosedimentieren bei nachträglicher Addition der snRNP - Partikel zu nativen und rekonstituierten RNP - Partikeln (Abb.21 c,d) genauso mit dem 40 S - Maximum der hnRNP - Partikel wie bei *in vivo* markierten Präparationen (Abb.21 a)). Die Fluorographien zeigen, daß speziell die snRNA - Spezies U1, die häufigste snRNA, in allen Fällen durch den Gradienten bis in den hnRNA - Bereich bandiert. Die völlige Abwesenheit der Bande U2 in einigen Fluorographien ist wahrscheinlich auf die bekannte hohe Nucleasesensitivität dieser Spezies zurückzuführen. Als Vergleich ist ein Sedimentationsprofil nebst RNA - Gel von einer freien snRNP- Fraktion gezeigt (Abb.21 b)).

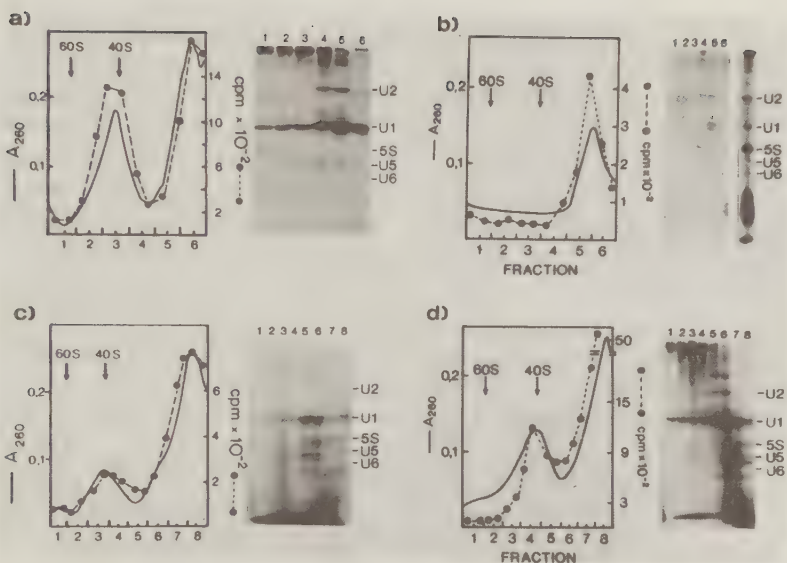


Abb. 21

snRNA U1 Verteilung über Sucrosegradienten verschiedener RNP-Fractionen:

a) Ein nativer nucleärer Extrakt von (^3H)-Uridin markierten HeLa-Zellen wurde auf 15-30%igen Sucrosegradienten aufgetrennt. In Aliquots der einzelnen Fractionen wurde die TCA-unlösliche Radioaktivität bestimmt (●---●). Jeweils zwei Fractionen wurden vereinigt, ethanolgefällt und auf 10 %igen Polyacrylamid/SDS Gelen wie beschrieben (s. 3.7.1) analysiert. Die Gele wurden fluorographiert wie von Laskey und Mills beschrieben (60). Fraction 5 entspricht der für die weiteren Experimente verwendeten 20S Region.

b) Rezentrifugation eines 20S Bereichs. Die Bedingungen entsprechen denen in a).

c/d) Sucrosegradientenanalyse eines *in vitro* Assoziationsexperimentes von rekonstituierten MS2 RNP-Partikeln (c) bzw. nativen 40S hnRNP-Partikeln (d) mit einer radioaktiv markierten 20S Fraction (s. 21 a). Die Durchführung ist in 3.13 beschrieben.

Zur Überprüfung der RNP - Natur der mit dem hnRNP - Partikel cosedimentierenden snRNA wurden die 40 S - bzw. 20 S - Bereiche der jeweiligen Gradienten Tests mit Antikörpern gegen snRNP - Strukturen unterworfen. Diese Experimente wurden von Dr. Andra Boak und Prof. Paul F. Agris (Columbia, Missouri, USA) durchgeführt. Der Test basiert auf der Inhibition der Agglutination von antigenträgenden Zellen durch die Anwesenheit freien Antigens (107). Als Antikörper wurden anti - RNP Antiseren, die nur ein intaktes snRNP - Partikel als Antigen erkennen, bzw. anti - Sm Antikörper, die auch einzelne snRNP - Proteine binden, verwendet. Bei einigen Experimenten wurden alternativ Festphasen - Rias mit den gleichen Antiseren durchgeführt.

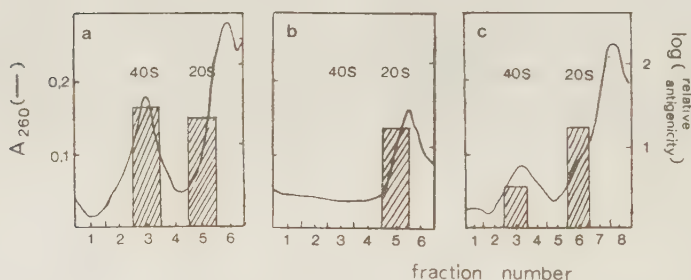


Abb.22

Immunologische Analyse der snRNP U1 enthaltenden Fraktionen:

- a) Die 20S bzw. 40S Region eines nativen nucleären Extrakts (entsprechend Abb.21 a)) wurden mittels RNP U1 Antiseren durch Radioimmunoassays untersucht. Die Durchführung ist in 3.14 beschrieben.
- b) Untersuchung der 20S bzw. 40S Region eines rezentrifugierten 20S Bereichs (entsprechend Abb.21 b)) durch Haemagglutination - Inhibitionstests, wie in 3.14 beschrieben.
- c) Haemagglutinations- Inhibitionstest eines Assoziationsexperiments wie in Abb.21 c).

"relative antigenicity" ist eine willkürliche Einheit, die aus der in den entsprechenden Löchern der Mikrotiterplatten spezifisch gebundenen Radioaktivität berechnet wurde (in a) - cpm/100). Der Logarithmus wurde verwendet, um die Werte in vergleichbare Größenordnungen mit dem Haemagglutinationstest zu bringen. In b/c) wurde der Verdünnungsfaktor der Probe, die noch eine Haemagglutinations - Inhibition ergab, als "relative antigenicity" definiert. Zur besseren Orientierung wurden die entsprechenden A_{260} - Profile in die Histogramme gezeichnet.

In Abb.22 erkennt man, daß in allen Fällen in 40 S - Fraktionen antigenes Material vorhanden ist. Dies beweist, daß nicht nur nackte snRNAs, die auf den Fluorographien deutlich zu erkennen sind, sondern intakte snRNP - Partikel in Wechselwirkung mit den hnRNP - Komplexen stehen.

Als weitere Kontrollen wurden Rekonstitutionsexperimente von hnRNP - Partikeln mit nackter snRNA, sowie Rekonstitutionen von snRNP - Fraktionen an nackte MS 2 - RNA durchgeführt. Außerdem wurde in Gegenwart von 200 mM NaCl bzw. 10 fachem Überschuß (in A_{260} - Einheiten) an Polyuridyl- bzw. Polyadenylsäure rekonstituiert (Abb.23). Aus den Ergebnissen können folgende Schlüsse gezogen werden:

Nackte snRNA ist nicht in der Lage mit hnRNP - Partikeln zu wechselwirken, dagegen binden snRNP - Partikel gut an nackte MS 2 - RNA. Daher ist anzunehmen, daß der primäre Kontakt einerseits von der RNA - Komponente der hnRNP - Strukturen und andererseits von der Proteinkomponente der snRNP - Partikel ausgeht. Der snRNA bleibt nach diesem Modell die Aufgabe, der Wechselwirkung durch Basenpaarung die nötige Spezifität zu verleihen.

Die Kontrollen mit hoher Ionenstärke und Polynucleotid - Konkurrenz ergaben das erwartete Bild, das diese Hypothese stützt: Die Wechselwirkung zwischen snRNP - und hnRNP - Partikeln wird gestört.

Ein weiterer Schluß wird durch diese Experimente möglich: Die Bindung der snRNP - Partikel scheint nicht von der Art der eingesetzten RNA abhängig, d.h. es ist kein Intron - Exon Übergang zur Bindung notwendig. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, daß die snRNP - Bindung auch an mit poly(U) oder poly(A) rekonstituierte Partikel gefunden wird (s. Legende zu Abb.21). Man kann daher die gemessene Wechselwirkung als ein "Abtasten" der hnRNA bzw. MS 2 RNA auf spezifische Sequenzen betrachten, mit denen die snRNA - Komponente der kleinen Partikel basenpaaren, und damit den Spleißvorgang vermitteln kann.

Daß diese Bindung eine inhärente Eigenschaft beider Partikel ist und nicht durch weitere Faktoren vermittelt wird, wird gestützt durch Experimente, in denen zum einen hochgereinigte snRNP - Partikel (isoliert durch matrix-gekoppelte Antikörper (40)) zu Bindungsstudien eingesetzt

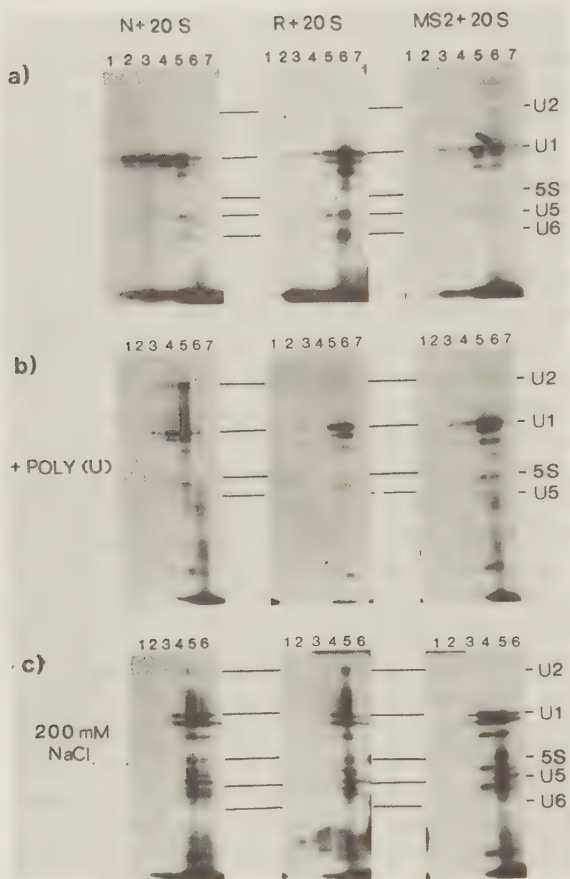


Abb. 23

Gelelektrophoretische Analyse verschiedener snRNP - hnRNP Assoziationsexperimente. Gradientenzentrifugation und Analyse wurden wie beschrieben durchgeführt.

a) Assoziationsansätze von radioaktiv markierten 20S snRNP - Fraktionen mit nativen 40S hnRNP - Partikeln (N+20S), rekonstituierten MS2 RNP - Partikeln (R+20S) und nackter MS2 RNA (MS2+20S). Spur 3 entspricht jeweils dem 40S Bereich, Spur 5,6 dem 20S Bereich.

b) Die gleichen Ansätze wie in a) wurden in Gegenwart eines 10 - fachen Überschusses von Polyuridylsäure (in A₂₆₀ - Einheiten, bezogen auf die RNA - Menge der 20S Fraktion) assoziiert und zentrifugiert. Spur 3: 40S Region; Spur 5,6: 20S Region.

c) Die gleichen Ansätze wie in a) wurden in Gegenwart von 200 mM NaCl assoziiert und analysiert. Spur 2,3: 40S Region; Spur 5: 20S Region.

wurden und andererseits aufgereinigte pelletierte hnRNP - Partikel verwendet wurden. In allen Fällen kann eindeutig snRNP - Material im Bereich des 40 S - Maximums festgestellt werden (Abb.24).

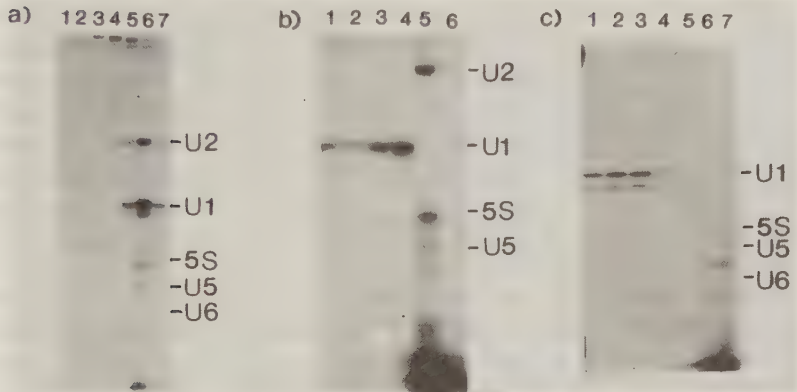


Abb. 24

Assoziationsexperimente von snRNAs und snRNPs mit rekonstituierten MS2 RNP - Partikeln.

a) Assoziationsexperiment von rekonstituierten MS2 RNP - Partikeln mit nackter snRNA. Nach Proteinase K Verdauung des 20S Bereichs und Phenolisierung erfolgte die Durchführung wie in 3.14 beschrieben. Man beachte, daß keine snRNA U1 im 40S Bereich zu sehen ist.

b) Assoziationsexperiment unter Verwendung einer hochaufgereinigten snRNP - Fraktion: Die snRNP - Partikel waren durch Affinitätschromatographie mittels Sepharose gekoppelter anti-m^{2,2,7}G - Antikörper isoliert worden. Sie wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Appel zur Verfügung gestellt. Man beachte die größere Intensität der U1 RNA Bande im 40S Bereich, verglichen mit anderen Assoziationsansätzen mit MS2 RNP - Partikeln. Dies könnte auf die Verwendung der hochaufgereinigten snRNP - Partikel zurückzuführen sein, die nicht, wie die sonst verwendeten 20S Regionen, gewisse Anteile an defekten snRNP - Partikeln enthalten.

c) Assoziationsexperiment von pelletierten, rekonstituierten MS2 RNP - Partikeln mit einer snRNP - Fraktion.

4.9 Neutronenkleinwinkelstreuung an 35S RNP-Partikeln

Die beste Möglichkeit die dreidimensionale Struktur eines biologischen Makromoleküls bis hin zur Angabe der einzelnen Atomkoordinaten zu analysieren bietet die Röntgenstrukturanalyse für Kristalle von Proteinen und Nucleinsäuren (108, 109). Die meisten Proteine und besonders Nucleoprotein-komplexe zeigen jedoch keine Neigung zur Kristallisation oder liefern für die Strukturanalyse ungeeignete Kristalle und sind zudem meist nur in verdünnten wässrigen Lösungen handhabbar. Daher sind die bekannten Daten über die meisten biologischen Makromoleküle auf diesen Zustand bezogen. Leider liefern Röntgenbeugungsexperimente an Makromolekülen in verdünnter Lösung nur verwaschene Streubilder, die lediglich eine beschränkte Interpretation erlauben. Hier bietet die Neutronenstreuung eine attraktive Alternative. Obwohl einzelne Streubilder eine vergleichbar geringe Aussagekraft haben, bietet die Tatsache, daß verschiedene Isotope des gleichen Elements - hier ^1H und $^2\text{H}=\text{D}$ - stark unterschiedliche Streueigenschaften haben, die Möglichkeit, sog. Kontrastvariationsexperimente durchzuführen. Eine Erläuterung dieser Experimente wird in Kapitel 4.9.3 und 4.9.4 gegeben. Im folgenden wird versucht, eine anschauliche Beschreibung der durchgeführten Messungen zu geben. Abb.25 zeigt schematisch den Aufbau der Versuchsanordnung.

4.9.1 "Kalte" Neutronen - Erzeugung und Monochromatisierung

Die im Inneren eines Reaktors durch Kernspaltung entstehenden Neutronen sind sehr energiereich und müssen durch Wechselwirkung mit sog. Moderatoren auf verwendbare Geschwindigkeiten abgebremst werden. Als Moderatoren verwendet man "leichte" Elemente (niedrige Ordnungszahl) oder Verbindungen leichter Elemente, da die "heißen" (=energiereichen) Neutronen nach dem Impulssatz am effektivsten ihre Energie an solche Atome abgeben, deren Masse nicht wesentlich größer ist. Nach hinreichend häufigen Stößen mit den Moderatoratomen nehmen die Neutronen die mittlere Temperatur des Moderators mit einer entsprechenden

mittleren Geschwindigkeitsverteilung ein. Mit Wasser oder D_2O bei 300 K als Moderator erhält man z.B. sogenannte "thermische" Neutronen. Nach dem deBroglie Gesetz

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v} \quad (1)$$

lässt sich die mittlere Wellenlänge thermischer Neutronen bei Raumtemperatur zu etwa 0,15 nm bestimmen. Dies entspricht recht gut der Wellenlänge der Cu - K_{α} - Linie des Röntgenspektrums.

Für Komplexe der Größenordnung 10 nm sind allerdings "kalte" Neutronen - mit größerer Wellenlänge - besser geeignet, da der differentielle Streuquerschnitt eines Neutrons mit der Wellenlänge wächst (s. 4.9.2). Diese entstehen durch Wechselwirkung mit einem Moderator sehr tiefer Temperatur, üblicherweise flüssigem Deuterium bei 15 - 25 K.

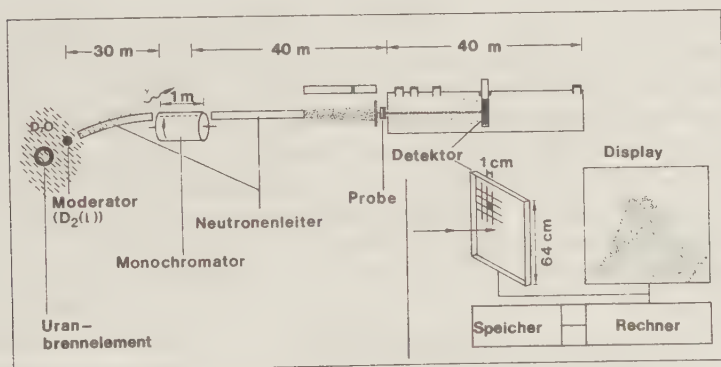


Abb.25

Schematische Darstellung der Messanordnung am Gerät D11 des Instituts Laue - Langevin, Grenoble. Sämtliche im Kapitel 4.9 behandelten Ergebnisse wurden an diesem Messgerät erzielt. Zur Orientierung: Die Entfernungsangabe von 40m hinter der Probe bezeichnet den maximal möglichen Detektorabstand. Als Moderator wurde die sog. "kalte Quelle" aus flüssigem Deuterium bezeichnet. Das das Brennelement umgebende D_2O wirkt natürlich ebenfalls als Moderator. Die Zeichnung ist mit geringen Änderungen von Stuhmann (108) übernommen.

Neutronen können durch Neutronenleiter ohne großen Energieverlust über mehrere 10 m kanalisiert werden. Neutronenleiter sind schwach gekrümmte evakuierte Stahl- oder Glashohlrohre, die nur Neutronen oberhalb einer Grenzwellenlänge von etwa 0,25 nm erlauben, durch Totalreflexion einer neuen Richtung zu folgen.

Neben der erwünschten Neutronenleitung erfüllt diese Anordnung den Zweck, hochenergetische Gammastrahlen und sehr schnelle Neutronen von den empfindlichen Proben und Instrumenten fernzuhalten.

Die erforderliche Monochromatisierung der Neutronen, die den Moderator in einer kontinuierlichen Geschwindigkeitsverteilung verlassen, geschieht für niederenergetische kalte Neutronen durch mechanische Geschwindigkeitselektoren. Dazu dient eine rotierende Walze mit helicalen Schlitzten, deren Ein- bzw. Auslass um einen Winkel α versetzt sind. Diese kann nur von solchen Neutronen passiert werden, die gerade so schnell fliegen, daß sich während ihrer Flugzeit die Walze um den entsprechenden Winkel dreht. Die Breite des Wellenlängenbereichs ist ein Kompromiß zwischen ausreichender Intensität des Neutronenstrahls zur effizienten Messung und der Unschärfe der Messung, hervorgerufen durch die Überlagerung der Wellenlängen-abhängigen Streukurven. Im Falle unserer Messungen betrug die Halbwertsbreite der Wellenlängenverteilung 8 %.

4.9.2 Die Streuung an Makromolekülen

Der auf die Probe treffende Neutronenstrahl wird an den in der Lösung befindlichen Molekülen gestreut. Die Streuintensität ist von folgenden Parametern abhängig: extern von der Wellenlänge der Neutronen - sie nimmt zu mit dem Quadrat der Wellenlänge; und intern i) nimmt sie zu mit der Größe der streuenden Partikel, und hängt ab ii) von der Lage der Moleküle zum Neutronenstrahl, iii) von der Lage der Atome im Molekül zueinander und iii) von den Streulängen der streuenden Atome. Diese Streulängen b sind den Amplituden der emittierten Wellen gleichzusetzen. Sie sind charakteristische Größen für die Isotope der einzelnen

Elemente.

Aus den Streulängen bestimmt man die Streulängendichten in einer Probe nach der Formel (109, 110):

$$\rho_v = \frac{1}{V} \sum b_i \quad (2)$$

b_i entspricht den jeweiligen Streulängen der i Atome in einem Volumenelement V der Probe. Wegen der stark unterschiedlichen Streulängen von Wasserstoff und Deuterium ($b_H = -0,374$; $b_D = 0,66$ (in 10^{-12} cm)) ergeben sich als Streulängendichten für H_2O bzw. D_2O $-0,56$ bzw. $6,34 \cdot 10^{10}$ cm^{-2} (108, 110). Die Streulängendichten von Proteinen und Nucleinsäuren liegen zwischen diesen beiden Extremen.

Die Differenz der Streulängendichten von gelöster Probe (Protein bzw. RNP - Partikel) und Lösungsmittel ergibt den Kontrast $\bar{\rho}$ der Streumessung (108):

$$\bar{\rho} = \rho_v - \rho_s \quad (3)$$

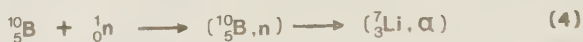
Man kann durch verschiedenartige Mischungen von H_2O und D_2O die Streulängendichten des Lösungsmittels und einer Komponente eines RNP - Partikels (also RNA oder Protein) einander angleichen. Dies bewirkt ein Verschwinden der entsprechenden Komponente im Hintergrund, so daß die andere in ihrer *in situ* Struktur gemessen werden kann. Diese Methode der Kontrastvariation ist, wie für ribosomale Proteine gezeigt (108, 111), ausbaubar auf Einzelkomponenten partikulärer Strukturen: Durch Deuterierung eines oder mehrerer ribosomaler Proteine können bei Messung in einem H_2O/D_2O Gemisch, dessen Streulängendichte genau der des Gesamtribosoms entspricht - dem "matching point" - die Streudaten dieser markierten Einzelproteine Informationen über ihre Position im Partikel bzw. zueinander liefern. Die Lage des "matching points" liefert zusätzlich Informationen über das RNA/Protein Verhältnis im zu messenden Partikel.

Die in Punkt i) erwähnte Abhängigkeit der Streuung von der Größe der Partikel ist ein entscheidender Faktor bei der Interpretation einer Streukurve. Zwei Parameter spielen eine wichtige Rolle: zum einen der Streumassenradius des Partikels, der dem Trägheitsmoment der Mechanik analog definiert ist - er ist näherungsweise umgekehrt proportional

zur Halbwertsbreite der Streukurve - ; zum anderen die Form der streuenden Partikel, die meist eine charakteristische Form der Streukurve verursacht. Durch Vergleich der gemessenen Abstandsverteilungen im Partikel mit Daten von mathematisch simulierten Modellpartikeln können Rückschlüsse auf die äußere Form und, durch zusätzliche Anwendung von Kontrastvariationen, auf den inneren Aufbau des streuenden Partikels gezogen werden.

4.9.3 Die Detektion

Der Detektor besteht aus 64×64 identischen Flächen von 1 cm^2 Größe. Er ist mit BF_3 des Isotops ^{10}B (angereichert für ^{10}B) gefüllt, welches durch Neutroneneinfang in α -strahlende ^{11}B -Teilchen überführt wird:



Die geladenen α -Teilchen sind elektronisch nachweisbar. Die Streukurve ist durch einen Intensitätsabfall zu größeren Streuwinkeln hin charakterisiert. Zum Zentrum der Streukurve hin ist ein extremer Intensitätsanstieg zu erkennen, der durch die ungestreuten Anteile des Neutronenstrahls verursacht wird. Dieser Anstieg überlagert die inneren Regionen der Streukurve und muß ausgeblendet werden, da er die Existenz sehr hochmolekularer Partikel vortäuscht. In der Praxis wird dies durch Einschub eines Cadmiumschildes von $6 \times 8 \text{ cm}$ Größe in das Zentrum des gestreuten Strahl erreicht.

4.9.4 Die Auswertung

Durch Summierung aller um den gleichen Winkel gestreuten Neutronen, also aller im gleichen Radius vom Zentrum des Detektors entfernten Detektionsergebnisse erhält man eine Intensitätsverteilung über den Radius des Detektors. Diese ist für kleine Winkel einer Gauss - Kurve annäherbar (Guinier - Näherung) (110, 112):

$$I(Q) = I(0) \cdot e^{-Q^2 R^2/3} \quad (5)$$

$$\ln I(Q) = \ln I(0) - \frac{1}{3} Q^2 \cdot R^2 \quad (6)$$

Dabei ist $I(Q)$ die Intensität der kohärenten Streuung; $I(0)$ die Nullwinkelstreuung in Richtung des Strahl (sie kann wegen der hohen Anteile ungestreuter Neutronen (etwa 50%) nicht direkt bestimmt werden), R der Streumassenradius und $Q=4\pi \sin\theta/\lambda$ mit λ als Wellenlänge des Neutronenstrahls und 2θ als Streuwinkel.

Auftrag von $\ln I(Q)$ gegen Q^2 ergibt den sogenannten Guinier-Plot, der im Bereich kleiner Q (also kleiner Streuwinkel - "Guinier-Bereich") durch eine Gerade annäherbar ist. Die Steigung dieser Gerade ist $-R^2/3$ und liefert somit einen Ausdruck für den Streumassenradius der gemessenen Partikel. Die Extrapolation der Gerade auf $Q^2=0$ ergibt einen Wert für $I(0)$, der Nullwinkelstreuung. Streumassenradius und Nullwinkelstreuung können aber auch - oft genauer - über die Integration der Abstandsverteilungsfunktionen erhalten werden (siehe dort).

In Abb. 26 sind die Streukurven ($\log I(Q)$ gegen Q) für native und rekonstituierte 35S RNP Partikel in verschiedenen H_2O/D_2O - Mischungen gezeigt.

Die Nullwinkelstreuung ist abhängig vom Kontrast ($\bar{\rho}$) der zu messenden Probe, der wiederum direkt abhängig vom H_2O/D_2O - Verhältnis im Lösungsmittel. Es kann gezeigt werden, daß gilt (113):

$$I(0) = (\bar{\rho} \cdot V_p)^2 \quad (7)$$

d.h.: daß $I(0)$ eine quadratische Funktion des Kontrastes ist. In Kombination mit den Gleichungen (2) und (3) ergibt sich:

$$\sqrt{I(0)} = \sum_i b_i - \rho_s V_p \quad (8)$$

Auftragung von $I(0)$ gegen den Anteil an Deuterium in der Probe (proportional $\bar{\rho}$) ergibt eine Gerade, die die Abszisse am "matching point" des Partikels schneidet. Der Vergleich mit dem "matching point" reinen Proteins (0,4) und reiner RNA (0,69) erlaubt eine sehr genaue Abschätzung des RNA-Protein Verhältnisses im gemessenen Partikel. Am

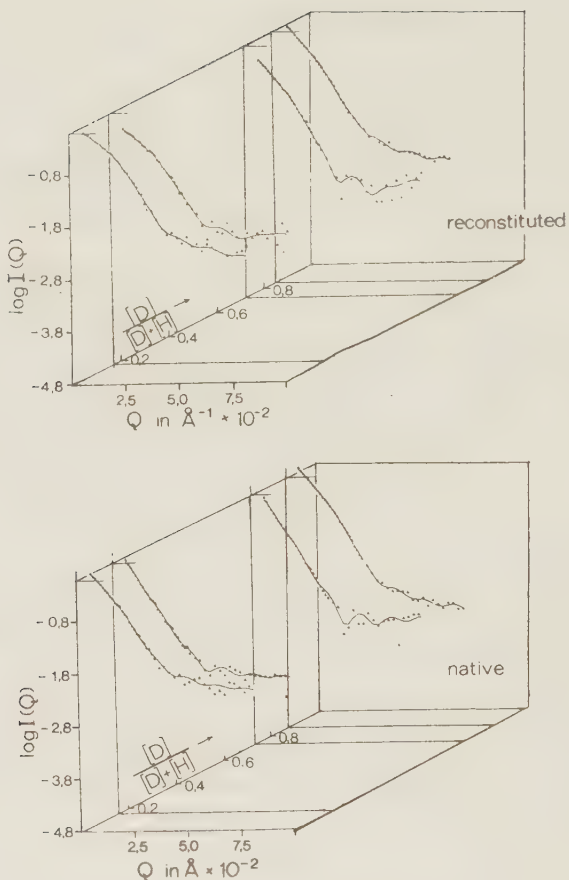


Abb. 26

Streukurven ($\log I(Q)$ gegen Q) von nativen und rekonstituierten RNP - Partikeln in vier verschiedenen $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ Mischungen. Berücksichtigt sind die kombinierten Streukurven von Messungen mit 2,6 und 5,6 m Detektorabstand (s. 3.15). Die Daten wurden auf H_2 - Streuung normalisiert. Unberücksichtigt blieben hier die Probenkonzentrationen ($c = 1,0 - 1,65 \text{ mg/ml}$) und die Transmissionswerte der Proben. Die Dreiecke bezeichnen die Streukurve, die durchgezogenen Linien die Ausgleichskurven, die aus den Abstandsverteilungsfunktionen in Abb. 28 abgeleitet wurden. Die Oszillationen bei größeren Q - Werten werden durch Terminationseffekte verursacht (die Abstandsverteilungsfunktion wurde auf einem maximalen Abstand von $r = 400 \text{ nm}$ festgelegt).

"matching point" gilt entsprechend Gleichung (8):

$$\sum b_i = \rho_s \cdot V_p \quad (9)$$

so daß diese Auftragung bei bekanntem $\sum b_i$ bzw. V_p das gemessene Volumen bzw. $\sum b_i$ ergibt.

In Abb. 27 ist diese Auftragung für native und rekonstituierte RNP - Partikel zu sehen. Aus den Nullwinkelstreuungen ergab sich für beide Partikel ein "matching point" bei 46,5% Deuterium. Die Steigung der Geraden, die einen Rückschluss auf das Partikelvolumen zulässt (s. Gleichung (8)), ist für beide Partikel fast identisch. Das ableitbare RNA - Proteinverhältnis berechnet sich zu 78% Protein und 22% RNA.

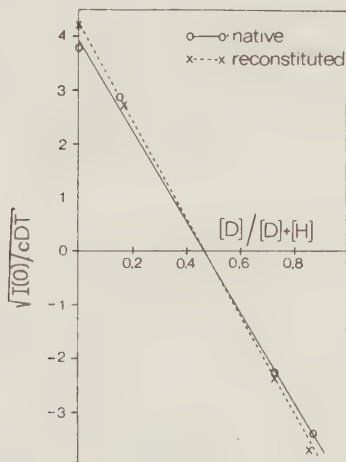


Abb. 27

Auftragung von $I(0)$ gegen die Deuteriumkonzentration in der Lösung. Die Werte der Nullwinkelstreuung $I(0)$ wurden aus den Abstandsverteilungsfunktionen als Fläche unter der Kurve (s. Abb. 28 = Betrag des Integrals) berechnet und auf Probenkonzentration c , Schichtdicke der Probe D und Transmission der Probe T normalisiert. Der ableitbare "matching point" ergibt unter Berücksichtigung der bekannt Werte für Protein (0,4) und RNA (0,69) ein Protein - RNA Verhältnis von 78 zu 22. Die nahezu identische Steigung der beiden Geraden weist auf gleiche Volumen der beiden Partikeltypen hin.

Eine weitere Aussage, die die Kenntnis der Nullwinkelstreuung $I(0)$ ermöglicht, ist eine Aussage über das Molekulargewicht des streuenden Partikels. Für die Streuung um den Winkel Null addieren sich die Anteile der einzelnen Teilchen in Lösung zur gesamten Nullwinkelstreuintensität $I(0)$ auf. $I(0)$ hängt daher nicht von der räumlichen Anordnung der Partikel ab, sondern nur von ihrer Anzahl und ihren Streueigenschaften. Für N gleiche Partikel gilt also in Erweiterung von Gleichung (8):

$$I(0) = N(\sum b_i - \rho_s \cdot V_p)^2 A \quad (10)$$

Der Faktor A beschreibt die Intensität des Ursprungsstrahl, die Größe der Probe, ihre Transmission und alle weiteren geometrischen Parameter des Experiments. Aus dem Faktor A , der Teilchenzahl N und der Proportionalität von $\sum b$ und V zu M_r ergibt sich in Anlehnung an die Herleitung von Jacrot und Zaccai (114) für das Molekulargewicht die Formel:

$$M_r = I(0) \cdot \left[\frac{1 - T_{H_2O}}{4\pi f \cdot I_{H_2O}} \right] \cdot \left[\frac{N_A \cdot 10^3}{c D T (\bar{v}_p)^2} \right] \quad (11)$$

Der erste Ausdruck in eckigen Klammern ist ein Korrekturfaktor für die Detektorempfindlichkeit und normalisiert auf absolute Intensität. Der zweite Faktor berücksichtigt die Probenkonzentration c , die Schichtdicke der Probe D , die Transmission der Probe T sowie das partielle spezifische Partikelvolumen $\bar{v}$ und die Exzess - Streulängendichte des Partikels $\bar{S}$.

Am "matching point" der RNA ergibt sich für den Proteinanteil der gemessenen RNP - Partikel ein Molekulargewicht von $M_r = 5,5 \cdot 10^5$. Die Berechnung des Molekulargewichts des Proteinanteils war notwendig, da nur die Proteinkonzentration mit der nötigen Exaktheit bestimmt werden konnte (s.3.14). Aus dem Protein/RNA Verhältnis ergibt sich das Molekulargewicht des Gesamtpartikels zu $M_r = 7 \cdot 10^5$.

Die Beziehung zwischen der Struktur eines Partikels und ihren Streudaten wird durch die sog. Abstandsverteilungsfunktion $P(r)$ beschrieben. Anschaulich wird durch $P(r)$ die Wahrscheinlichkeit beschrieben, einen

bestimmen Abstand r zwischen zwei streuenden Volumenelementen eines Partikels zu finden. Der Zusammenhang zwischen $P(r)$ und der Streuintensität $I(Q)$ ist gegeben durch:

$$P(r) = \frac{2\pi}{r} \int_0^{\infty} Q \cdot \sin(Q \cdot r) \cdot I(Q) dQ \quad (12)$$

Die zugrundeliegende Herleitung inklusive Fourier - Transformation ist beschrieben bei Glatter (115, 116). Aus $P(r)$ lassen sich auch Aussagen über den Gyrationradius, den häufigsten Abstand r und $I(0)$ machen.

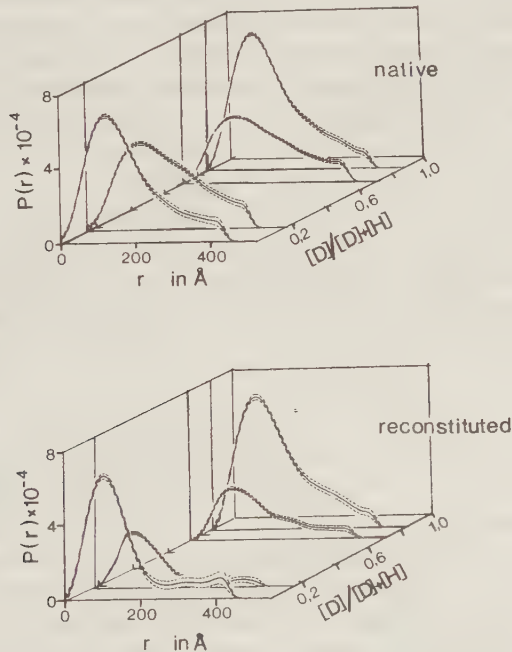


Abb. 28

Abstandsverteilungsfunktionen von nativen und rekonstituierten RNP - Partikeln in vier verschiedenen H_2O/D_2O Mischungen. Die Abstandsverteilungsfunktionen wurden entsprechend Glatters indirekter Fourier - Transformationsmethode (115, 116) berechnet. Sie beschreiben die Wahrscheinlichkeit, einen definierten Abstand r zwischen zwei Volumenelementen eines Partikels zu finden.

In Abb.28 sind die Abstandsverteilungsfunktionen von nativen und rekonstituierten RNP- Partikeln in verschiedenen H_2O/D_2O Mischungen gezeigt.

Die aus Abb.28 ableitbaren Daten der Streumessungen bei verschiedenen H_2O/D_2O - Mischungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Als Modelle für die 35S - RNP - Partikel kommen folgende Strukturen in Betracht: Als einfachstes Modell eine sphärische Struktur, die bis zur Scheibe abgeplattete Pole haben kann oder sogar, wie ein Modell von LeStourgeon et al (124) suggeriert, eine thoroidale, also ringförmige Struktur (s.Abb.30). Ellipsoide Strukturen können aufgrund der elektronen- mikroskopischen Daten ausgeschlossen werden (s. 4.6. und 20, 21, 25, 96).

Tabelle 4:

Liste der aus Abb. 28 ableitbaren häufigsten Abstände r in nativen (N) und rekonstituierten (RE) RNP - Partikeln bei verschiedenen H_2O/D_2O Mischungen.

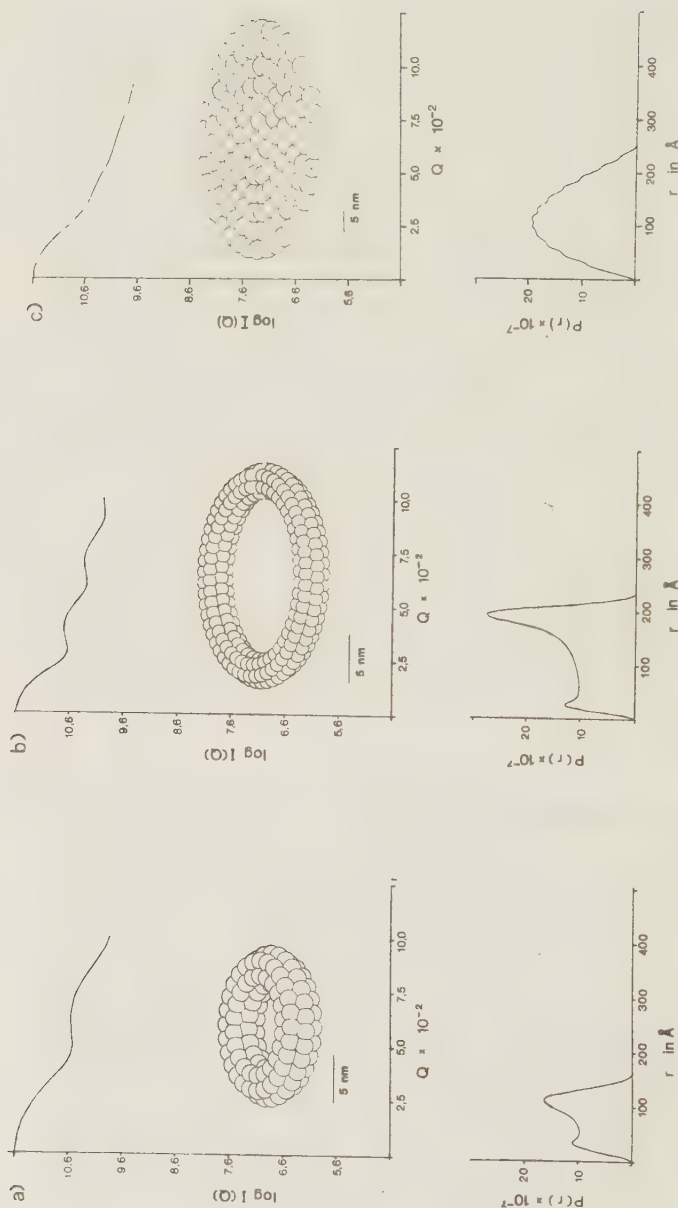
Probe	% Deuterium RE/N	r (in nm)	
		RE	N
D 0	0/0	11,0	12,3
D20	16,7/15,1	10,8	13,1
D85	72,5/72,5	12,0	12,9
D99	85,1/87,3	12,2	12,0

Die Probenbezeichnung bezieht sich auf das Mischungsverhältnis der H_2O - bzw. D_2O Proben während "% Deuterium" den echten, aus dem Kontrast der Transmissionmessungen berechneten Deuteriumanteil der Probe beschreibt. Dieser ist aufgrund der in der Probe vorhandenen Sucrose (s. 3.15) zwangsläufig niedriger als das Mischungsverhältnis angibt.

Durch mathematische Simulation lassen sich Modellstreu-
kurven von Strukturen geeigneter Abmessungen mit den
tatsächlichen Streudaten vergleichen. Man kann so auf die
wahrscheinlichste Struktur der streuenden Partikel
zurückschließen. In Abb.29 sind einige fiktive Streukurven
und die resultierenden Abstandsverteilungsfunktionen zu
sehen. Die beste Korrelation mit den gemessenen Streudaten
wird durch die in Abb.29 c) gezeigte flache Scheibe
erreicht. Thoroidale Partikel zeigen völlig unterschiedliche
Streu- und Abstandsverteilungskurven, während für sphärische
Komplexe die Werte von Streumassenradius und ableitbarem
Molekulargewicht nicht in Deckung gebracht werden können.
Der Zusammenhang zwischen dem Gyrationradius R und dem
realen Radius r eines Partikels ist abhängig von der Form
des Partikels. Für eine Kugel des Radius r gilt (117):
 $R = (3/5)^{1/2} \cdot r$; für eine unendlich dünne Scheibe des Radius
 r gilt: $R = (1/2)^{1/2} \cdot r$. Die richtige Beziehung für die in
Abb. 28 c) gezeigte Scheibe endlicher Dicke liegt zwischen
diesen Werten. Sie kann über das Volumen des Partikels genau
bestimmt werden. Dies wurde im Rahmen des Computerprogramms
berücksichtigt und in Form eines Maßstabsbalkens
ausgedruckt. Es ergibt sich ein Radius von 12,5 nm bei einer
Dicke von 2 nm.

4.9.5 Streudaten von RNP-Partikeln

Als wesentlichste Daten ergeben sich folgende Aussagen: Die
Streudaten der gemessenen Partikel korrelieren am besten mit
dem Modell eines Partikels mit einem Radius von 12,5 nm ,
einer Höhe von 2 nm und einem Molekulargewicht von $M_r = 7 \cdot 10^5$.
Dies bezieht sich auf die Streudaten der Messungen bei 0%
Deuterium von rekonstituierten Partikeln. Diese Probe wurde
gewählt, da sie weitgehend frei von hochmolekularen
Aggregaten war. Diese Tendenz zur Aggregation war eine
entscheidende Komplikation der Messungen. Insbesondere die
Proben höherer D_2O - Gehalte zeigten Aggregationsanteile von
bis zu 10 Prozent. Dieses Phänomen ist für D_2O - Lösungen
üblich. Besonders die Abstandsverteilungskurven werden von
dieser Aggregation betroffen. Hier wurde, da durch



Berechnete Streukurven ($\log I(Q)$ gegen Q) und Abstandsverteilungsfunktionen für Modellpartikel verschiedener Form ausgehend vom Volumen von 614 nm^3 . Das Volumen wurde aus Abb. 27 abgeleitet.

Abb. 29

- a) Beispiel eines Torus mit kleinem Loch im Zentrum.
 - b) Beispiel eines flachen Torus mit großem Zentralloch.
 - c) Beispiel einer flachen Scheibe.
- In der Abbildung sind jeweils die Radien der Komplexe durch Maßstabsbalken angegeben.

Elektronenmikroskopie der maximale Durchmesser der Partikel bekannt war, eine mathematische Unterdrückung der Streudaten von Komplexen mit mehr als 40 nm Durchmesser vorgenommen, da diese den Gyrationsradius zu zu hohen Werten verschieben würden.

Eine Betrachtung der Abstandsverteilungsmaxima in Tabelle 4 zeigt, daß die Werte für native Partikel geringfügig höher sind als für rekonstituierte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß an nativen Partikeln peripher zusätzliche Proteine assoziiert sind, die in den rekonstituierten Partikeln nicht mehr vorhanden sind.

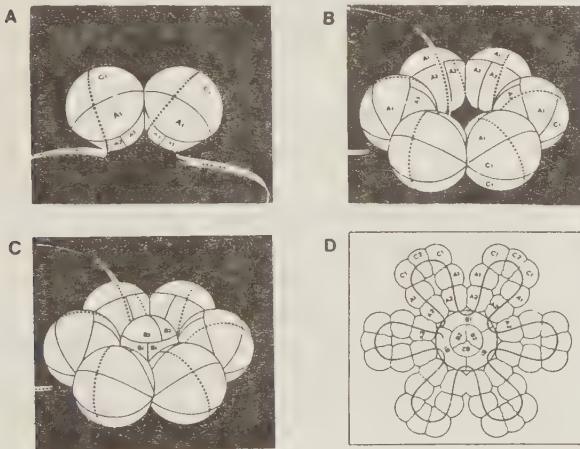


Abb. 30:

Modell von 40S - RNP Partikeln nach LeStourgeon et al (124).

- A) Subpartikel aus A1, A2, C1 und C2 umwunden mit einem RNA - Strang.
 - B) Sechs der Subpartikel aus A) lagern sich zu einem Thoroidalen Gebilde zusammen.
 - C) Im Mittelloch lagern sich die Proteine der B-Gruppe ein. Das entstandene Partikel hat ein Molekulargewicht von etwa $M_r = 2 \cdot 10^6$ und enthält die "Core" - Proteine im Verhältnis A1:A2:B1:B2:C1:C2 = 12:12:3:3:12:6.
 - D) Schematische Darstellung des Gesamtpartikels.
- Das Partikelmodell basiert auf biochemischen Untersuchungen, die Stöchiometrie aus Standard - Laemmli Gelen. Das Modell ist in Kapitel 5 diskutiert.

Aufgrund des sonst identischen Streuverhaltens beider Partikeltypen und der identischen Erscheinung in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, liegt es jedoch näher, den in nativen Partikeln größeren Anteil an Aggregation für dieses Verhalten verantwortlich zu machen.

Ein Vergleich der Abstandsverteilungen bei 17% Deuterium (die hauptsächlich durch RNA - Streuung verursacht wird) und bei 72% Deuterium (die Proteinstreuung repräsentiert) zeigt etwas höhere Werte für R bei 72% Deuterium (14.4 nm gegenüber 12,6 nm). Dies weist darauf hin, daß die RNA etwas stärker zum Zentrum des Partikels hin konzentriert vorliegt, als die Proteine. Ein solches Ergebnis ist sinnvoll, wenn man unterstellt, daß an der Oberfläche befindliche RNA - Teile zu exponiert für Nuclease - Angriffe wären, und daher durch Proteine geschützt werden. Kandidaten für diese Aufgabe wären die sauren C - Proteine C3/C3x, die RNA binden aber nicht unbedingt notwendig zur Stabilisierung des 35 S - Partikels sind (s. 4.6) und eventuell das Protein A1.

Unterstellt man, daß auch dieser Effekt auf die in 72% Deuterium höhere Aggregationstendenz zurückzuführen ist, so bliebe als Minimalaussage ein Gleichverhalten von Protein und RNA bezüglich ihrer Abstandsverteilungen bestehen. Dies würde für eine gegenseitige Durchdringung von Protein und RNA sprechen, ein Befund, der mit dem von LeStourgeon publizierten Modell (Abb.30 und (124)) übereinstimmt. Eine erhöhte Aggregation für diesen Effekt verantwortlich zu machen ist jedoch wahrscheinlich nicht korrekt, da dieser Effekt zu höheren Deuteriumkonzentrationen nicht stärker wird und er außerdem sehr reproduzierbar in beiden Partikeltypen auftritt. Sicher ableitbar ist jedoch in jedem Fall, daß kein dem "Informofer". (21) entsprechendes Proteinpartikel mit umlaufender RNA vorliegt.

5. Diskussion

Bereits Anfang der sechziger Jahre wurde über die Existenz von Ribonucleoproteinstrukturen in Zellkernen von Eukaryoten berichtet. Diese Entdeckungen wurden zunächst interpretiert als "nucleäre Ribosomen" oder "virale Partikel im Zellkern" (63, 118).

Zwischen 1962 und 1968 zeigten dann Samarina und Georgiev (21, 63, 119), daß neusynthetisierte RNA im Nucleoplasma mit Proteinen assoziiert vorliegt. Diese "D-RNA" - sie entsprach in ihrer Basenzusammensetzung weitgehend der DNA - oder hnRNA enthielt Sequenzen, die später als mRNA im Cytoplasma auftraten (63). Da nur ein kleiner Teil der hnRNA jemals als mRNA in Erscheinung trat (120), wurde postuliert, daß die Proteine dieser RNP - Komplexe am Prozessieren der hnRNA und an "Auswahl" und Export der späteren mRNA beteiligt sind (21).

Mit der Entdeckung, daß die codierende Sequenz von Strukturgenen in Eukaryoten durch intervenierende Sequenzen unterbrochen ist (121, 122, 123), gewann die Aufgabe des Prozessierungsapparates an Komplexität: Zusätzlich zum bisher angenommenen Herausschneiden der mRNA aus einem größeren Vorläufer - etwa analog den rRNAs -, der Kappenbildung und der Polyadenylierung musste nun ein basengenaues Herausschneiden der Introns und ein Wiederverknüpfen der Exons gewährleistet werden (s. Einleitung). Unklar ist, ob die Rolle der hnRNP - Proteine in dieser Reaktionsfolge die von reinen Verpackungsproteinen - etwa analog den Histonen - überschreitet. Allerdings ist selbst in diesem Fall eine genaue Charakterisierung der hnRNP - Komplexe und ihrer RNA- und Proteinkomponenten unerlässlich, da sie zumindest einen Teil der Matrix bilden, an der der Prozessierungsvorgang abläuft.

Wie durch Elektronenmikroskopie von Transaktionskomplexen gezeigt werden kann, entstehen die hnRNP - Komplexe noch während der Transcription an nascierender hnRNA (20). Sie lassen sich als sphärische Partikel mit Durchmessern von 15 - 25 nm sichtbar machen (20, 25, 46, 65).

Ergebnisse verschiedener Gruppen deuten darauf hin, daß die Anordnung der hnRNP - Partikel auf der hnRNA nicht statistisch ist (20, 155). Es ist allerdings ungeklärt,

welche Parameter die Orientierung des Partikels beeinflussen. Eine Anordnung nach Introns oder Exons ist nicht nachweisbar (155). Da die RNA - Bindung der hnRNP - Proteine keine Sequenzspezifität zeigt (s. 4.6.2), müssen die potentiellen Bindungssignale strukturelle Unterschiede in der hnRNA sein. Eine Möglichkeit bilden kurze Doppelstrangbereiche, die durch Rückfaltung der nascierenden hnRNA entstanden sind. Von doppelsträngiger RNA ist bekannt, daß sie weder *in vivo* (93) noch *in vitro* (s. 4.6.2) an der hnRNP - Bildung beteiligt ist. Dadurch könnte eine gewisse regionale Ordnung der Partikelbildung bewirkt werden. Ein ähnliche Rolle könnte den snRNP - Partikeln zugesprochen werden, die über Basenpaarung Exon - Intron Übergänge erkennen und binden und somit als Orientierung für die Partikelbildung dienen können.

Die Bestandteile der RNP - Partikel

Zur Untersuchung der RNP - Komplexe bedient man sich der 35-40 S hnRNP - Partikel, die die grundlegenden Monomeren der kompletten nativen hnRNP - Oligomeren repräsentieren. Gewonnen werden sie durch die Aktivierung endogener Nucleasen aus isolierten Zellkernen und durch weitere Aufreinigung der entstandenen nucleären Extrakte durch Gradientenzentrifugation und/oder Pelletierung. Ihre Identität mit Komponenten von *in vivo* vorkommenden RNP - Strukturen wurde lange Zeit angezweifelt; hauptsächlich weil kein biologischer Test existierte, der ihre Funktion beschrieb. Ein solcher Test fehlt auch heute noch, allerdings ist durch *in vivo* und *in vitro* Quervernetzungs-experimente mit UV - Licht gezeigt worden, daß die 40 S hnRNP - Partikel *in vivo* als integrale Strukturen existieren (99, 101). Gleichzeitig wurde gezeigt, daß *in vitro* in isolierten Kernen neusynthetisierte hnRNA mit den beschriebenen "Core" - Proteinen vernetzbar ist (25, 103). In dieser Arbeit wurde ergänzend gezeigt, daß *in vitro* bestrahlte hnRNP - Partikel aus nucleären Extrakten identische RNA - Protein Kontakte haben, wie in den beschriebenen *in vivo* - Experimenten (s. 4.7). Dies mag als Nachweis gelten, daß während der Isolation der Partikel

durch die pH 8/Diffusionmethode (21) keine internen Umlagerungen stattfinden.

Die üblichen Präparationsmethoden liefern relativ heterogene Populationen von RNP - Partikeln, die zudem noch stark durch lose assoziierte Proteine "kontaminiert" sind. Dies erschwert Aussagen über die physikalischen Eigenschaften der Partikel, sowie darüber, welche Proteine echte Komponenten der "Core"- hnRNP - Partikels sind. Die beschriebenen Werte reichen von 1 bis 40 Proteinen (z.B. 21, 22, 24, 25, 64, 65). Die bis dahin umfassendste biochemische Analyse der hnRNP - Partikel lieferten Beyer et al (25) für HeLa S3 Zellen. Sie definierten 6 Proteine der Molekulargewichte $M_r = 30.000 - 42.000$ als sogenannte "Core" - Proteine, die am Aufbau des Partikels beteiligt sind. Zweidimensionale Analyse der "Core" - Proteine zeigt allerdings eine komplexe Mischung von etwa 20 gut anfärbbaren und einigen schwächeren Proteinflecken im interessierenden M_r - Bereich (s. 4.1 und (26, 27)).

Das in dieser Arbeit beschreibende Rekonstitutionssystem ermöglicht - in Kombination mit anderen analytischen Methoden (s. 4.1) - eine Aussage über die an der Partikelbildung beteiligten Proteine. Aufgrund der in Kapitel 4.1 definierten Parameter wurden 14 Proteine als wichtigste Komponenten definiert, die in Erweiterung der von Beyer et al. (25) vorgeschlagenen Nomenklatur mit A1, A1x, A2, B1a, B1b, B1c, B2, C1, C2, C3, C3x, D1, D2, D3 und D4 bezeichnet wurden. Fast alle dieser Proteine haben Ladungsisomere, die in den meisten Fällen auf Phosphorylierung zurückzuführen sind. Das Proteinpaar A1/A1x konnte als Konformenpaar charakterisiert werden, während das Paar C3/C3x einige Charakteristika eines Vorläufer - Produkt Verhältnisses zeigt (s. 4.2.3).

Verschieden konzipierte Rekonstitutionsexperimente zeigten, daß die Spezies C3/C3x und die Proteine der D - Gruppe zur Bildung eines Partikels nicht zwingend notwendig sind (s.4.6.4), sich jedoch, wenn sie anwesend sind, mit hoher Spezifität an die RNP - Strukturen anlagern. Aus der Gruppe der D - Proteine ist z.B. das Protein D4 hauptsächlich mit höhermolekularen Komplexen assoziiert, während D1-D3 bevorzugt im monomeren Partikel vorliegen (s. 4.5). Es liegt nahe, diese Proteine als "periphere" "Core" - Proteine

einzustufen, die nicht im Innern des Partikels befindlich sind.

Ein ähnliches Phänomen ist für das Protein A1 bzw. A1x festgestellt worden (s. 4.6.5 und (30)). Allerdings ist die Ab- bzw. Anwesenheit dieses Protein proliferationsabhängig (s. 4.1; 4.6.5 und (30, 31)).

Zu klären bleibt, welche Proteine als notwendige Bestandteile zur Partikelbildung dienen. Die Voraussetzungen für derartige Experimente sind durch die Anwendung einer Elektroelutionstechnik nach Hunkapiller et al. (52) in Kombination mit ein- oder zweidimensionaler Gelelektrophorese geschaffen worden.

Das hier entwickelte *in vitro* Rekonstitutionssystem erforderte einen Nachweis der Identität der rekonstituierten Partikel mit den nativen 40S - hnRNP - Partikeln. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde gleichzeitig eine Charakterisierung der hnRNP - Partikel durchgeführt. Es ergab sich eine Stöchiometrie von A1:A2:B1a,b,c:B2:C1/C3:C2/C3x = 10:10:6:2:8:4 (s. Tabelle 1) für native und rekonstituierte RNP - Partikel aus HeLa - Zellen. Diese Werte stimmen recht gut mit der von Beyer et al. (25) aus Standard - Laemmli Gelen abgeleiteten Stöchiometrie überein. Elektronenmikroskopisch zeigt sich die bereits beschriebene runde Struktur mit einer Größenverteilung von 15 - 25 nm. Die Dichten beider Partikel wurden in Metrizamid zu 1,27 g/cm³ (in H₂O) bzw. 1,33 g/cm³ (in D₂O) bestimmt, was mit publizierten Daten über Rattenleber -, Lymphocyten - und Erythrocyten - RNP - Partikeln übereinstimmt (20,25,30,65). Des weiteren wurden für beide Partikel nach UV - Quervernetzung identische RNA - Protein Kontakte (s. 4.7) sowie ein identisches Streuverhalten in der Neutronenkleinwinkelstreuung (s. 4.9) festgestellt.

Die Charakterisierung der "Core" - Proteine

Eine Charakterisierung der Proteine der hnRNP - Partikel bezüglich ihrer physikalischen Eigenschaften wie isoelektrische Punkte und Molekulargewichte ergab die in Tabelle 1 zusammengefassten Daten. Bemerkenswert sind

besonders die großen Unterschiede zwischen den M_r -Werten unter 8M Harnstoff und ohne Harnstoff, die auf sehr stabile, SDS - resistente Sekundärstrukturbereiche in den "Core" - Proteine schließen lassen (s. 4.2). Eine Zuordnung dieser Bereiche als -Helices oder β -Faltblätter auf Grund von Aminosäurezusammensetzungen ist nicht möglich. Betrachtet man allerdings den hohen Anteil an β -Strukturen (ca. 30% laut CD - Messungen(30)) im A1 - analogen hnRNA - bindenden Protein aus *Physarum polycephalum*, das den "Core" - Proteinen in vielerlei Hinsicht ähnelt und zudem mit anti - A1 Antikörpern kreuzreagiert, liegt die Vermutung nahe, daß die "Core" - Proteine ähnliche Sekundärstrukturbereiche besitzen. Der extrem hohe Anteil an Glycin in den "Core" - Proteinen deutet auch in diese Richtung.

Die Aminosäurezusammensetzungen der "Core" - Proteine sind in mehr als einer Hinsicht ungewöhnlich: Neben den erwähnten hohen Glycinwerten (20-27%) fällt besonders eine signifikante Menge N^G, N^G -Dimethylarginin in allen "Core" - Proteinen außer C3/C3x auf, sowie die Existenz des symmetrischen Isomeren N^G, N'^G -Dimethylarginin in mindestens zwei Proteinen (B1a, B1c (s.4.5)). Ein Vergleich mit den Zusammensetzungen von 68 "durchschnittlichen" Proteinen nach Jukes et al. (83) zeigt erhebliche Abweichungen der "Core" - Proteine besonders was die unpolaren Spezies Ala, Val, Leu, Ile und die aromatischen Aminosäuren Tyr und Phe angeht. Kleinere Abweichungen sind für Thr und die basischen Aminosäuren Lys, His und Arg zu erkennen. Der erhöhte Anteil der letzteren drei Aminosäuren korreliert gut mit dem basischen Charakter der Proteine.

Da davon ausgegangen werden muß, daß die evolutionäre Anpassung an die Umweltbedingungen für alle durchschnittlichen Proteine (bzw. deren Gene) gleich verlaufen ist, sollten sich die Aminosäurezusammensetzungen solcher durchschnittlichen Proteine in gewissen Grenzen ähneln. Aus erheblichen Abweichungen vom Durchschnitt muß daher auf eine spezielle Selektion - wahrscheinlich durch Funktion - geschlossen werden. Die hohe Interspezies - Konservierung der "Core" - Proteine weist ebenfalls auf eine spezielle Funktion hin (s. 4.3 und (46, 77)). Dies wird später ausgiebig diskutiert werden.

Die Daten der Aminosäurezusammensetzungen und Peptidkarten

deuten auf eine Gruppe distinkter, jedoch eng verwandter Proteine hin (s. 4.2 und 4.5). Der Grad der Verwandtschaft ist innerhalb von Untergruppen so stark (s.4.5), daß sich die Vermutung einer gemeinsamen Herkunft dieser Proteine aufdrängt. Berücksichtigt man, daß in dem niederen Eukaryoten *Physarum polycephalum* nur ein einziges hnRNA bindendes Protein identifiziert wurde (30, 86), das noch dazu immunologisch kreuzreagiert mit hnRNP - Antikörpern (30), könnte man folgern, daß in höheren Eukaryoten die Gene der "Core" - Proteine durch Duplikationen und Punktmutationen aus einem oder wenigen Ursprungsgenen entstanden sind. Dabei wurden alle Mutationen toleriert, die die Funktionalität des Proteins verbesserten. Als Ergebnis dieser Evolution erreichte der Eukaryot eine erhöhte Flexibilität seines posttranscriptionalen Prozessierungsapparates. Die Isolation der Gene der "Core" - Proteine wird hier genauere Aussagen ermöglichen.

Die oben angesprochene Funktion der "Core" - Proteine im Prozessierungapparat ist, abgesehen von der "Verpackung" der hnRNA, ungeklärt; allerdings weisen einige Experimente zumindest auf eine indirekte Beteiligung an Regulationsvorgängen hin. So ist gezeigt, daß die Modifikationsrate der "Core" - Proteine vom Wachstumszustand der Zellen abhängig ist (s.4.1) und daß hochmodifizierte "Core" - Proteine eine reduzierte Tendenz zur Partikelbildung zeigen (s. 4.6.5). Damit können modifizierende Enzyme die Verpackungseffizienz der hnRNA beeinflussen und das Gleichgewicht zwischen Degradation der hnRNA und Prozessierung bzw. Export in Richtung Degradation verschieben. Dafür spricht auch die Tatsache, daß in Lymphocyten in den ersten Stunden nach Concanavalin A - Stimulation die Polyadenylierung und der Export von hnRNA zunimmt, während die Transcriptionsrate noch unverändert ist (98).

Interessant ist in diesem Zusammenhang das unterschiedliche *in vivo* Phosphorylierungsverhalten der Konformen A1/A1x (s. 4.2.3). Zwar werden *in vitro* phosphoryliertes und unphosphoryliertes A1x gleich gut in RNP - Komplexe eingebaut, jedoch kann man *in vivo* wohl eine funktionelle Ursache dieses Phosphorylierungsverhaltens annehmen.

Da die A1 - Expression eine starke Abhängigkeit von der Proliferation der Zellen zeigt, könnte dieses Protein unmittelbar in die Regulation der Prozessierung eingreifen, was wiederum durch das beschriebene Konformerengleichgewicht bzw. das Phosphorylierungsverhalten kontrolliert werden könnte.

Das Partikelmodell

Über die interne Struktur und die äußere Form der 35-40S hnRNP - Partikel war trotz einiger biochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen bislang kaum eine fundierte Aussage möglich. Eine Analyse der inneren Struktur würde gleichzeitig eine Aussage über die Art der RNA - Protein Wechselwirkung und der daran beteiligten Proteine erlauben.

Gezeigt ist, daß Proteine der C-Gruppe - mit großer Wahrscheinlichkeit die Spezies C3/C3x - eine hohe Affinität zu RNA haben (s. 4.6; 4.7 und (99, 102)) und daß alle Proteine des "Core" - Partikels, jedoch nicht die Proteine der D - Gruppe, Kontakt zur RNA haben (s. 4.7 und (101)). Weiterhin haben LeStourgeon et al. (124) gezeigt, daß besonders die Proteine A2 und B1, sowie in geringerem Maß C1 und B2, zu einem nucleaseresistenten Kern des hnRNP - Partikels gehören. Gleichzeitig zeigen diese Proteine im Partikel eine erhöhte Resistenz gegen Trypsinangriff. Für die Proteine der A - Gruppe ist gezeigt, daß sie relativ leicht durch hohe Ionenstärken vom Komplex abdissoziiert werden können (25).

Aus den Neutronenstreuungsdaten kann abgeleitet werden, daß sich die RNA wahrscheinlich geringfügig weiter im Inneren des Partikels befindet (s. 4.9). Zudem weisen Verdauungsexperimente darauf hin, daß die hnRNP - Partikel nuclease - labil sind und nach Verdauung mit RNAase völlig zerfallen (s. 4.6.1 und (25, 64)). Die beiden letzten Befunde sprechen eindeutig gegen das von Kulguskin und Georgiev vertretene "Informoer" - Modell, das ein für sich stabiles Protein - Partikel mit außen umlaufender RNA postuliert (s. auch 4.9.5 und (20, 22)).

Einige zusätzliche Informationen liefert das hier verwendete

Rekonstitutionssystem. Es wurde gezeigt, daß die RNA - Protein Wechselwirkung völlig sequenzunabhängig ist und daß doppelsträngige Nucleinsäuren von der Partikelbildung ausgeschlossen sind (s. 4.6.2). Bindungsstudien an MS2 - RNA zeigten, daß speziell das Protein A1 erst sehr spät an das entstehende RNP - Partikel bindet.

Diese Daten erlauben einige Hypothesen über die innere Struktur des Partikels: Die basischen "Core" - Proteine A2, B1a,b, B2 und C1 könnten den Kern eines RNP - Partikels bilden, der einen RNA - Strang bindet. Das Protein A2 wird dabei peripher eingelagert, da seine Bindung relativ salzlabil ist. Die neutralen Proteine B1c und C2 sind möglicherweise ebenfalls beteiligt. Aussagen hierüber sind aufgrund der von Beyer et al. (25, 30) verwendeten eindimensionalen Gele nicht möglich.

Aufgrund der sehr niedrigen DI - Werte im Vergleich von B1c und C2 mit den Proteinen D1, D2 und D3 könnte man für sie auch eine ähnliche Funktion wie diese 3 Proteine postulieren (s. 4.4 und 4.5). Die Proteine sedimentieren bevorzugt mit monomeren 30-35S Partikeln und werden als "periphere" Proteine angesehen (s. oben).

Eines oder mehrere der obigen Subpartikel haben dann zusätzlich an der Oberfläche die Proteine C3/C3x und A1 angelagert. Dabei bindet C3/C3x sehr fest an die RNA des Subpartikels, während A1 in Kontakt mit der RNA steht aber nicht unbedingt fest an die RNA bindet (siehe dazu 4.7). In mitotisch inaktiven Zellen ist A1 als proliferationsabhängiges Protein verzichtbar.

Der periphere Charakter von A1 und C3/C3x in diesem Modell korreliert gut mit der salzlabilen Bindung von A1, sowie mit der Tatsache, daß alle drei Proteine nicht essentiell zur Bildung eines Partikels notwendig sind. Die hohe Stabilität der Bindung der C - Proteine gegen NaCl (25) im Gegensatz zu A1 ist kein Widerspruch, da die Art der Bindung eine andere (an RNA) ist als bei A1. Neuere Experimente weisen darauf hin, daß die C3 - RNA Bindung sogar stabil gegen 9,2M Harnstoff ist (Birgit Henrich, Bochum, pers. Mitteilung). Unter der Voraussetzung, daß mindestens eins der verschiedenen "Core" - Proteine in jedem Komplex vorhanden ist, ergibt das relative Molekulargewicht eines derartigen Partikels aus der Stöchiometrie abgeleitet Vielfache

von $1,6 \cdot 10^6$. Allerdings wird durch diese starre Betrachtung des Modells die notwendige Flexibilität der hnRNA - Protein Wechselwirkung nicht gewährleistet, die die unterschiedliche Größe und Struktur der hnRNA - Moleküle fordert. Daher sollten derartige Vorhersagen von M_r - Werten mit der nötigen Vorsicht betrachtet werden, insbesondere was die Stöchiometrie oligomerer Komplexe angeht. Es ist nicht sicher, und dafür bietet die Stöchiometrie der großen RNP - Komplexe in Abb. 10 (>50S) einen Hinweis, daß die Verteilung der als peripher bezeichneten Proteine in Oligomeren dem monomeren Status gleicht. Diese Abbildung bildet zudem ein Indiz für den peripheren Charakter der Spezies B1c und C2, die, wie die Proteine D1-D3, stark reduziert erscheinen.

Die in Kapitel 4.9 beschriebenen Neutronenstreuungsmessungen zeigen, wie vage M_r -Abschätzungen aus Stöchiometrien sein können. Hier ergibt sich aus den Streudaten ein partikuläres Gewicht von $M_r = 7 \cdot 10^6$. Dabei entspricht das aus dem "matching point" ableitbare RNA - Protein Verhältnis den publizierten Werten (21, 65, 124). Es ergab sich ein Verhältnis von 22:78 (RNA:Protein). Die äußeren Abmessungen der nativen und rekonstituierten Partikel korrelieren bezüglich ihrer Streudaten gut mit Modellen eines scheibenförmigen Komplexes mit einem Radius von 12 nm und einer Höhe von 2 nm. Von einem derartigen Partikel kann in der Tat elektronenmikroskopisch die bekannte kreisrunde Form des Durchmessers von etwa 20 nm erwartet werden. Im folgenden ist kurz dargestellt, daß die Molekulargewichtsbestimmungen aus der Neutronenstreuung realistischer sind als Abschätzungen aus der Stöchiometrie:

Unter Berücksichtigung der Dichten der RNP - Partikel von $1,27 \text{ g/cm}^3$ (in Metrizamid, s.4.6.1 und (65)) bzw. $1,40 \text{ g/cm}^3$ (in CsCl (22)) ergeben sich für kompakte Partikel der gemessenen Gestalt M_r -Werte von $7 - 8 \cdot 10^6$. Für eine globuläre Form gleichen Durchmessers würde sich dagegen ein Partikelgewicht von $M_r = 6 \cdot 10^6$ ergeben. Das Partikelgewicht von $7 \cdot 10^6$ passt zudem gut zu den gefundenen S-Werten von 35-40S im Sucrosegradienten, während eine globuläre Struktur der obigen Größe einen S-Wert von mehr als 100S haben sollte (124). Weiterhin erklärt die Form einer Scheibe zwanglos die relativ geringfügige S-Wert - Zunahme bei der Analyse oligomerer Partikel (s.4.6.3 und (21)), wenn man eine

Aneinanderlagerung der Monomeren wie in Abb. 17 zugrundelegt. Kompakte Strukturen wie Polysomen zeigen erheblich größere Zunahmen im S-Wert (s. 4.6.3 und (97)). Man erkennt, daß die Daten der Neutronenstreuung schlüssig mit anderen bekannten Werten in Beziehung gebracht werden können.

Als Folge dieser Betrachtung muß das obige Partikelmodell ergänzt werden: Man kann postulieren, daß die auf 2-D Gelen beobachtete Stöchiometrie einen Mittelwert zwischen mehreren verschiedenen Partikeltypen darstellt, die zwar alle aus Subpartikeln der beschriebenen Art mit peripher gebundenem A1 und C3/C3x bestehen, in denen jedoch nicht immer die gleiche Anzahl der entsprechenden Proteine vertreten sein muss. Im Extrem wären die basischen "Core" - Proteine gegeneinander austauschbar. Der außerordentlich niedrige DI - Wert innerhalb dieser Gruppe könnte auf eine solche Austauschbarkeit hinweisen.

Das präsentierte Modell entspricht in gewisser Hinsicht einem von LeStourgoen et al. vorgeschlagenen Partikelmodell (s. Abb. 30 und (124)). Allerdings werden dort Daten aus eindimensionalen Gelen zugrundegelegt, so daß es nicht ohne weiteres mit dem hier abgeleiteten Modell vergleichbar ist. Außerdem erlaubt das Modell von LeStourgoen, in dem sich sechs Subpartikel zu einem abgeflachten RNP - Komplex addieren, nicht die Flexibilität, die die Heterogenität der hnRNA fordert.

Die Protein - RNA Wechselwirkung

Keines der bekannten Modelle macht eine Aussage über die Art der Bindung der "Core" - Proteine an die RNA. Die Rekonstitutionsexperimente zeigen in Übereinstimmung mit publizierten *in vivo* - Daten (93), daß doppelsträngige Bereiche von der Partikelbildung ausgeschlossen sind. Die von Beyer et al (25, 30) vorgebrachte Spekulation über die Wechselwirkung eventueller β - Strukturen in den "Core" - Proteinen mit doppelsträngigen hnRNA - Bereichen wird damit hinfällig. Das Gleiche gilt für einen anderen potentiellen Kandidaten zur Vermittlung von Protein - RNA - Wechselwirkungen - das methylierte Arginin (N^G, N^G -Dimethylarginin).

Von Arginin ist bekannt, daß es doppelsträngige Nukleinsäuren über seine Guanidinogruppe binden kann (125, 126). Die Methylierung der Guanidinogruppe sollte die Basizität der Seitenkette reduzieren und damit die potentielle Bindung an doppelsträngige RNA beeinträchtigen. Daher wurde postuliert, daß die Verwendung von Dimethylarginin statt Arginin die für den Prozessierungsvorgang notwendige Dynamik in der RNA - Protein - Wechselwirkung gewährleistet (124). Dies ist aus den obigen Gründen nicht gegeben.

Allerdings sind einige andere Funktionen für diese Modifikation vorstellbar. So muß auf ein RNA - bindendes Protein des niederen Eukaryoten *Artemia salina* hingewiesen werden - HD 40 - , das den "Core" - Proteinen bezüglich der Aminosäure - Zusammensetzung relativ ähnlich ist und ebenfalls erhebliche Mengen an Dimethylarginin enthält (161). Für dieses Protein sind durch CD - und ORD - Messungen helixentwindende Eigenschaften nachgewiesen worden (162). Eine ähnliche Funktion könnte einigen "Core" - Proteinen zugewiesen werden, zumal die Bildung von RNP - Partikeln und sogar Oligomeren auf MS 2 - RNA und rRNA, die beide erhebliche Mengen an Sekundärstruktur aufweisen, die Existenz einer solchen Aktivität geradezu fordert.

Eine andere potentielle Aufgabe des Dimethylarginins wäre die Erkennung doppelsträngiger RNA - Bereiche, neben denen sich die RNP - Partikel anordnen. Man hätte damit eine Erklärung für die vorne erwähnte nicht statistische Anordnung der RNP - Partikel auf der hnRNA.

Denkbar ist ebenfalls eine Kombination beider Funktionen: Ein Dimethylarginin - haltiges Protein bindet einen Doppelstrangbereich reversibel und die helixdestabilisierende Aktivität faltet Bereiche geringerer Stabilität auf. Bei stabileren Regionen bleibt die Auffaltung erfolglos. In beiden Fällen dienen jedoch die entsprechenden Proteine als Nukleationszentren für die Partikelbildung. Dadurch wird eine nicht statistische Anordnung der Partikel verursacht.

Derartige Betrachtungen sind jedoch vorläufig als Spekulation zu werten, da nur wenig experimentelle Beweise für ein solches Verhalten existieren.

Zu diskutieren bleibt in diesem Zusammenhang die Tatsache,

daß die RNP - Proteine unspezifisch einzelsträngige Nukleinsäuren, also auch rRNA und einzelsträngige DNA binden (s. 4.7). Diese Unspezifität der Bindung scheint sinnvoll, wenn man sich klarmacht, daß im Nukleoplasma eine spezifischere Bindung überflüssig wäre, da zum einen DNA einzelsträngig nicht frei vorliegt - sie ist entweder von den Proteinen des Replikationsapparates oder denen der Transkription bedeckt - und zum andern rRNA sich streng kompartimentalisiert in den Nucleoli befindet. Dadurch bleibt die hnRNA *in vivo* das einzig mögliche Substrat für die "Core" - Proteine.

Funktionelle Betrachtungen

Die Beteiligung der snRNAs in Form von snRNP - Partikeln beim Herausschneiden der Introns in höheren Eukaryoten ist allgemein als sehr wahrscheinlich anerkannt.

Über die bekannte Assoziation von snRNAs und hnRNP - Partikeln (38), sowie über die bekannte Komplementarität zwischen den Consensus - Sequenzen der Exon - Intron - Übergänge und den 5'-Enden der snRNA U1 hinaus (32, 36) wurde gezeigt, daß durch Antikörper gegen snRNP U1 das Prozessieren von mRNA - Vorläufern inhibiert wird. So wurde wiederholt gezeigt, daß in Kernen von Adenovirus infizierten HeLa - Zellen durch anti - RNP U1 - Antikörper die Synthese reifer mRNA inhibiert wird (106, 127), und daß snRNP U1 spezifisch die 5'-Spleiss-Stelle auf der hnRNA bindet (128). Weiterhin ist gezeigt worden, daß in den "Puffs" polytärer *Drosophila* - Chromosomen, also Orten hoher Transkriptionsaktivität, anti-RNP U1 Antigene existieren (129). Neben einem weiteren Hinweis auf die Beteiligung der snRNPs am Prozessieren zeigt dieses Experiment, daß es sich bei den snRNPs um sehr konservative Partikel handelt.

Es ist jedoch ebenfalls gezeigt worden, daß besonders in niederen Eukaryoten Spleissen auch ohne die Mitwirkung einer snRNA stattfinden kann. Dabei kann - wie für rRNA - Vorläufer aus *Tetrahymena* gezeigt wurde (130, 131) - das Prozessierungssystem auf das Vorhandensein des zu spleissenden Vorläufers selbst reduziert werden. Hier wurde *in vitro* gezeigt, daß unter geeigneten ionischen Bedingungen

in Gegenwart von Guanosin oder Guanosinphosphaten ein Selbstspleissen und eine Religation ohne Hilfe eines Proteins stattfinden kann.

Der nächstkomplexere Fall, das Spleissen und Religation durch Proteine, aber ohne Mitwirkung einer RNA - Komponente, ist im mitochondrialen Hefesystem durch eine teilweise im Intron - Bereich kodierte Maturase realisiert. Dieses Protein reguliert über das Herausschneiden des zweiten Introns des cyt b - Gens seine eigene Synthese (132).

Ein weiteres Beispiel der Prozessierung ohne Beteiligung einer RNA ist das Spleissen von tRNA - Vorläufern. Hier gewährleistet wahrscheinlich die rigide Sekundär- und Tertiärstruktur des tRNA - Vorläufers eine korrekte Erkennung, so daß eine RNA - Komponente im Spleissapparat überflüssig wird (133, 134).

Anders dagegen das korrekte Zurechtschneiden des 5'-Endes der tRNA: Dies geschieht in *E. coli* durch die RNAase P, ein Protein, das eine RNA - Komponente von etwa 360 N Länge (M1 RNA) enthält (135, 136).

Mit diesem System liegt der früheste bekannte Fall der Beteiligung einer RNA an Erkennung, Fixierung und Prozessierung eines RNA - Vorläufers vor. Slonimski formulierte darauf aufbauend seine "Guide"-RNA Hypothese, der zufolge die RNA - Komponente die Erkennung der Schnittstelle, sowie die Fixierung der resultierenden Enden durch Basenpaarung vermittelt, während die eigentlichen enzymatischen Vorgänge durch assoziierte Proteine wie Nucleasen und Ligasen durchgeführt werden (137). Im Fall des hnRNA - Prozessierens käme den snRNAs die Rolle derartiger "Guide"-RNAs zu.

Über den Ablauf der Erkennung der Exon - Intron Übergänge existieren bislang nur Spekulationen. Die Bindung selbst war als salzlabil (>100 mM NaCl) und EDTA - stabil beschrieben worden (39, 138). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assoziationsexperimente weisen darauf hin, daß die Bindung der snRNAs ein zweistufiger Prozeß ist. Die primäre Assoziation der snRNP - mit den hnRNP - Partikeln wird durch die Proteine der snRNP - Partikel und die RNA - Komponente der hnRNP - Partikel vermittelt. Dafür sprechen die Daten in Kapitel 4.8, denen zufolge nackte snRNA nicht an hnRNP - Partikel bindet, während snRNP - Partikel durchaus in der

Lage sind, an nackte MS 2 RNA zu assoziieren. Letzterer Befund zeigt ebenfalls, daß diese primäre Assoziation sequenzunabhängig ist. Die Wechselwirkungen entsprechen in ihrem Verhalten Protein - RNA Wechselwirkungen und gleichen den für native Assoziation beschriebenen.

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt folgende Modellvorstellung über die snRNP - hnRNP Wechselwirkung nahe:

In einem ersten Schritt vermitteln die snRNP - Proteine eine sequenzunabhängige, salzlabile Bindung zur hnRNA. Bei Erkennen eines Exon - Intron Überganges bindet dann die snRNA spezifisch diese Sequenz. Der erste Schritt dieser zweistufigen Bindung könnte als Abtasten der hnRNA auf spezifische Sequenzen verstanden werden.

Dieser Vorgang wäre in etwa vergleichbar mit der Wechselwirkung des RNA - Polymerase "Core" - Enzyms mit der DNA, das nach Bindung des σ -Faktors hochspezifisch Promotorsequenzen bindet.

Eine Beteiligung von RNA - Komponenten an der Erkennung definierter Sequenzen scheint bei Eukaryoten weit verbreitet zu sein. So wurde gezeigt, daß an der Herstellung der korrekten 3'-Enden der hnRNA ebenfalls ein snRNP - Partikel beteiligt ist (15, 140, 141). Die RNA - Komponente dieses Partikels erkennt, wie vermutet wird, die Sequenz 5'...AAUAAA...3' in der 3'-Region der hnRNA und vermittelt die spezifische Spaltung (s. Einleitung). S. Berget schlug als RNA - Komponente aufgrund von Homologiestudien die snRNA U4 vor (142).

Es ist gezeigt worden, daß assoziiert mit U4 die snRNA U6 in einem gemeinsamen snRNP - Partikel vorliegt (143). Es liegt also nahe anzunehmen, daß beide kleinen RNAs zur spezifischen Funktion nötig sind.

Für die snRNA U3 wurde eine Beteiligung am Prozessieren der rRNA - Vorläufer postuliert (144). Man darf aufgrund der über snRNAs bekannten Daten sicherlich annehmen, daß sie diese Funktion als Bestandteil eines snRNP - Partikels ausübt.

Wenigstens zwei Punkte bleiben jedoch ungeklärt: Keines der Spleissmodelle erklärt, wie die Fixierung der Exon - Enden nach erfolgtem Nucleaseschnitt bis zur Religation gewährleistet ist. Als Kandidaten für diese Aufgabe bieten sich die snRNP - Proteine an, die, wie gezeigt, RNA -

Bindungs - Eigenschaften haben (s. 4.8). Es ist allerdings ebenfalls denkbar, daß eine weitere RNA - Komponente die Exonenden durch Basenpaarung fixiert. Ohshima schlug für eine solche Aufgabe die snRNA U2 vor, die an ihrem 3'-Ende Basenhomologien zu den relativ konservativen Exonenden zeigt (105).

Weiterhin bleibt offen, ob die enzymatische Aktivität des Spleissvorgangs in jedem Fall einem Protein zuzuschreiben ist. Die Befunde im *Tetrahymena* - System zeigen, daß auch eine RNA diese Rolle übernehmen kann. Unterstützt wird dieses durch neuere Daten über RNAase P, denen zufolge die RNA - Komponente der enzymatisch aktive Teil des Komplexes ist (136). Es ist nicht ausgeschlossen, daß im Fall des hnRNA - Spleissens ebenfalls die snRNAs das Schneiden und Religieren direkt ausführen. Auch Berichte verschiedener Gruppen über Pb^{2+} - katalysierte tRNA - Spaltung (145) oder Mg^{2+} - katalysierte Linearisierung von Viroiden (146, 147) sprechen für eine solche Fähigkeit des kationen - katalysierten Selbstspleissens der RNA.

Es gibt bereits theoretische Betrachtungen und ein möglicher Mechanismus wurde vorgeschlagen (148):

Das Modell setzt sogenannte "splicer" - RNAs voraus, die Intron- und Exonenden fixieren. Für diese Rolle werden die snRNAs U1 (für die Intronfixierung) und U2 (für die Exonfixierung) vorgeschlagen. Als erster Schritt werden S_N2 -artige Angriffe der 2'-OH- Gruppen auf die Phosphodiester-Gruppen angenommen (analog der RNAase A - Reaktion), die zu cyclischen 2'-3'- Phosphaten führen. Diese Angriffe finden parallel, wahrscheinlich durch Kationen (Mg^{2+}) unterstützt, sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende des Introns statt (Abb.31). Derartige cyclische 2'-3'- Phosphate sind bereits in verschiedenen Systemen nachgewiesen worden (134, 149, 150).

In einem zweiten Schritt greift entweder das 5'-O -Anion des letzten Exonnukleotids direkt (Fall 2b), oder nach Phosphorylierung das O- Anion der 5'- Phosphatgruppe (Fall 2a), die cyclische Übergangsverbindung nucleophil an. Dieser Angriff führt im Fall 2b zum gewünschten religierten Produkt, während im Fall 2a das entstehende 3'- O- das 5'- Phosphat angreift und die Spaltung zum 2'-3'-Diphosphat bewirkt (Abb.31).

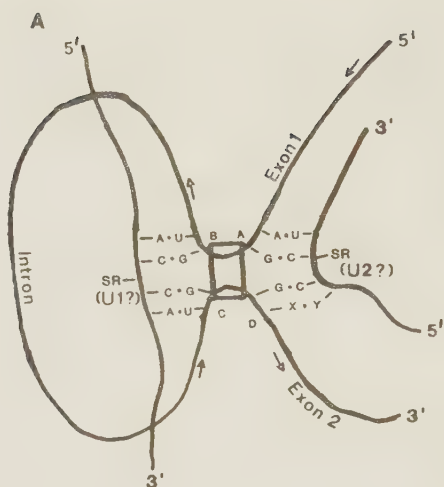
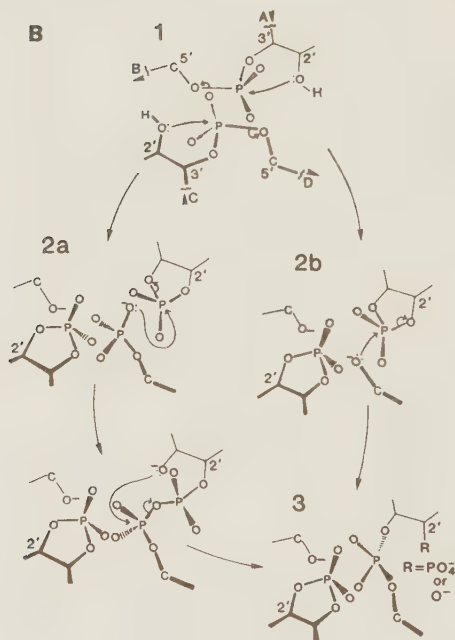


Abb. 31:

Spleiss - Modell nach McCumber und Ornstein (148)

A) Schematische Darstellung einer Spleissstelle, fixiert von zwei snRNAs (SR). Eingezeichnet sind die sehr konservativen Nucleotide an den Exon - Intron Übergängen.

B) Vorschlag zweier Mechanismen zum Selbstspleissen einer hnRNA. Gezeigt ist die Anordnung der reaktiven Gruppen im eingerahmten Rechteck in Abb. 31A). Zur Orientierung sind die einzelnen Ketten mit A, B, C und D bezeichnet. Das Modell wird im Text diskutiert.



Die im Fall a notwendige Phosphorylierung wäre durch eine spezifische Kinase durchzuführen. Produkte einer solchen Phosphorylierung (5'-Phosphate) wurden im niederen Eukaryoten *Chlamydomonas* (149) nachgewiesen. Das Endprodukt des Weges 2a (2'-Phosphat) konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden.

Im Fall 2b könnte das im ersten Schritt entstehende 5'-O-Anion durch Metalle (Mg^{2+}) stabilisiert werden, oder müßte vor dem zweiten Schritt durch enzymatische Aktion (evtl. einer Ligase) geschaffen werden.

Von beiden vorgeschlagenen Wegen scheint 2b der plausiblere zu sein, da dort enzymatische Aktionen nicht unbedingt notwendig sind. Die in Fall 2a nötige Phosphorylierung würde eine zumindest kurzfristige Auflösung des Spleiss-Zentrums erfordern, um die Substrate für die enzymatischen Aktionen zugänglich zu machen. Dadurch würde das ohnehin labile System zusätzlich destabilisiert werden. Andererseits sind die ionischen Bedingungen in den *in vitro* - Systemen von *Tetrahymena* (130, 131) und RNAase P (136) derart (100mM Mg^{2+}), daß durch Kationen - Koordination die O-Anionen (2'-, bzw. 5'-O-) genügend stabilisiert sind um Reaktionsweg 2b zu ermöglichen.

Es ist nicht auszuschließen, daß ein Großteil der zellulären Prozessierungsvorgänge einem derartigen kationen - katalysierten Mechanismus folgt. Den Proteinen der snRNP - Partikel käme neben der Schutzfunktion gegen Nucleasen evtl. die vorne beschriebene Rolle der primären RNA - Bindung zu. Nicht geklärt wird durch einen derartigen Mechanismus die Existenz verzweigter hnRNA, wie sie von Wallace und Edmonds in HeLa - Zellen gefunden wurde (151). Unterstellt man, daß es sich dabei um Zwischenprodukte des Prozessierens handelt, könnten solche Strukturen entstehen, wenn bereits vor dem endgültigen Herausschneiden des Introns die Exonenden ligiert werden. Diese Entdeckung impliziert wie auch die vorne aufgezählten unterschiedlichen Prozessierungsvorgänge, daß es sich beim Spleissvorgang nicht um einen universellen Mechanismus handelt, sondern um einen vielschichtigen, den jeweiligen Erfordernissen angepaßten Prozess.

Zwei Aspekte des posttranscriptionalen Prozessierens, die nur indirekt mit der Thematik dieser Arbeit in Zusammenhang stehen, müssen der Vollständigkeit halber noch erwähnt werden. Der eine Punkt ist das Verhalten des Prozessierungsapparates nach Hitzeschock, d. h. nach Streß. Mayrand und Pederson (153) haben gezeigt, daß nach Hitzeschock die Verpackung neusynthetisierter hnRNA durch "Core" - Proteine inhibiert wird. Stattdessen tritt eine im Verhältnis 1:9 (Protein : RNA) mit Proteinen assoziierte RNA auf. Gleichzeitig wird die Hauptmenge an hnRNA nicht mehr zu reifer mRNA prozessiert. Im Cytoplasma erscheinen neben den Hitzeschock - mRNAs nur noch Histon - mRNA, α - und β -Interferon- sowie einige andere mRNAs. Alle gefundenen RNAs stammen von intronlosen Genen. Es wird der Schluß gezogen, daß intronlose hnRNA einem zweiten, seltener benutzten Prozessierungsmechanismus unterworfen ist (153, 154). Dies wird unterstützt durch weitergehende Analysen, denen zufolge ein geringer Anteil der nicht in "Core" - Proteine verpackten hnRNA auch in Nicht - Hitzeschock - Zellen gefunden wird (154). Daraus ergeben sich einige interessante Fragen, z. B.: ob die Inhibition der RNA - Verpackung durch veränderte Modifikation der "Core" - Proteine verursacht wird, wie die Ergebnisse aus Kap. 4.6.5 vermuten lassen und welcher Art der alternative Prozessierungsvorgang ist. Dies führt zum zweiten Aspekt der bisher nicht behandelt wurde: der potentiellen Beteiligung der nucleären Matrix am Prozessierungsvorgang.

Es ist beschrieben worden, daß hnRNA mit der nucleären Matrix assoziiert vorliegt (155, 156). Desgleichen wurde gezeigt, daß die hnRNP "Core" - Proteine salzlabil mit der Matrix in Kontakt stehen und daß die sauren C - Proteine in Matrixpräparationen vorhanden sind (26, 79, 99, 102). Andererseits werden mehr als 80% der hnRNA durch die pH8/Diffusionsmethode in Form von 40S hnRNP - Partikeln freigesetzt (s. 4.1), und es wurde gezeigt, daß *in vitro* in Zellextrakten der Spleissvorgang ohne die Anwesenheit der nucleären Matrix oder Teilen der Matrix vermittelt werden kann (157, 158).

Zu klären bleiben unter anderem die Fragen:

i) Ist die hnRNA als Bestandteil von hnRNP - Partikeln mit der nucleären Matrix assoziiert oder gibt es Sequenzen auf der hnRNA, die nicht mit "Core" - Proteinen stattdessen aber direkt mit der Matrix verbunden sind?

ii) Welche Funktion haben die sauren C - Proteine in der nucleären Matrix - wird durch sie die Bindung von hnRNA an die Matrix vermittelt?

iii) Gibt es hnRNA - Spezies, die direkt an der nucleären Matrix ohne Beteiligung von "Core" - Proteinen prozessiert werden und handelt es sich bei diesen um die vorne erwähnten intronlosen hnRNAs? Einige neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß in der Tat bestimmte evtl. konstitutiv exprimierte RNAs direkt an der Matrix prozessiert werden (159, 160).

Daraus ergibt sich Punkt iv): Hat die nucleäre Matrix direkt teil am Spleissvorgang oder ist sie eher am Transport und Export der hnRNA beteiligt? Die Beantwortung dieser Fragen wird wesentliche Erkenntnisse zur mRNA - Reifung bringen, insbesondere was die Regulation der Prozessierung angeht.

6. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurde versucht die 35 - 40 S hnRNP - Komplexe zu charakterisieren, die mRNA - Vorläufer und eine Gruppe basischer niedermolekularer RNA enthalten. Das Ausgangsmaterial waren HeLa - S3 Zellen, die in permanenter Zellkultur gehalten wurden, sowie Rinderlymphocyten, die aus Lymphknoten frisch getöteter Rinder gewonnen und in Primärkultur gehalten wurden. Aus diesen Zellen wurden mittels geeigneter Aufschlußtechniken (hypotone Lyse, Homogenisierung) Zellkerne präpariert, die bei leicht erhöhter Temperatur und pH 8 extrahiert wurden. Der nucleäre Extrakt wurde über Sucrosegradientenzentrifugation bei 89000 x g aufgetrennt. Die hnRNP - Strukturen, die bei 40 S (Svedberg) sedimentieren, stellen sich elektronenmikroskopisch als sphärische Partikel mit etwa 20 nm Durchmesser dar. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese gelang eine Charakterisierung der Proteinkomponenten bezüglich Ladung und Molekulargewicht.

16 Proteine wurden isoliert und mittels Peptidkartierungen, Aminosäureanalysen und "difference index" - Bestimmungen als distinkte aber eng verwandte Proteine definiert.

Fast alle dieser Proteine (außer C3/C3x) zeigen Ladungsisomerisation, die im Lymphocytensystem wesentlich stärker ausgeprägt ist. *In vivo* und *in vitro* Phosphorylierungsexperimente zeigten, daß ein Teil dieser Modifikationen auf Phosphorylierung zurückzuführen ist.

Zur Untersuchung der Struktur dieser Partikel wurden verschiedene Wege eingeschlagen. Zum einen wurde ein *in vitro* Rekonstitutionssystem entwickelt, welches Rückschlüsse auf notwendige Komponenten der RNP - Struktur und auf *in vivo* Prozesse erlaubt. Es konnte gezeigt werden, daß die Proteine A1, C3/C3x und die Proteine der D-Gruppe nicht notwendig zur Bildung eines 35S - Partikels sind. Weiterhin wurde gezeigt, daß die RNA - Protein Wechselwirkung nucleotidsequenzunabhängig und einzelstrangspezifisch ist. Rekonstitutionsexperimente im Lymphocytensystem zeigten, daß hochmodifizierte "Core" - Proteine eine reduzierte Fähigkeit zur Partikelbildung und damit zur RNA - Verpackung bewiesen. Zum anderen wurden am Laue - Langevin Institut in Grenoble Neutronenstreuungsmessungen durchgeführt, die Aufschluß über

äußere Form, Molmasse und RNA - Protein Anordnung und -Verhältnis gaben. Die Auswertung weist auf eine scheibenförmige Struktur von 12 nm Radius und 2 nm Höhe mit einem Molekulargewicht von $M_r = 7 \cdot 10^6$ hin. Das Protein : RNA Verhältnis wurde zu 78 : 22 bestimmt. Die Streudaten deuteten auf eine gegenseitige Durchdringung von Protein und RNA hin. Diese Daten zur geometrischen Form des Partikels stehen im Einklang mit dem Sedimentationsverhalten besonders der oligomeren hnRNP - Strukturen.

Abgerundet wurden diese Untersuchungen durch UV - Quervernetzungen zur Identifikation von RNA - Protein Kontakten. Diese ergaben, daß alle "Core" - Proteine in Kontakt mit der RNA stehen, daß aber besonders C3/C3x fest an RNA gebunden sind.

Basierend auf diesen Daten wurde die Wechselwirkung von hnRNP - Partikeln mit snRNP - Partikeln untersucht. Letztere sind an vielen Reaktionen der hnRNA Prozessierung beteiligt. *In vitro* Assoziationsexperimente von snRNP - Partikeln und snRNA an native und rekonstituierte 40S RNP - Partikel zeigten, daß die Wechselwirkung beider Partikel durch die Proteine der snRNPs und die RNA der hnRNP - Partikel vermittelt wird. Da die endgültige Bindung von snRNA und hnRNA ausgeht, wurde eine zweistufiger Bindungsprozeß postuliert.

7. Literaturverzeichnis

1. Chambon P. (1975)
Eucaryotic nuclear RNA polymerases
Ann. Rev. Biochem. 44, 613 - 638
2. Perry R.P. (1976)
Processing of RNA
Ann. Rev. Biochem. 45, 605 - 629
3. Jordan E.G. (1978)
The nucleolus
2nd edition, Oxford, University Press
4. Roop D.R., Kristo P., Stumph W.E., Tsai M.J. & O'Malley B.W. (1981)
Structure and expression of a chicken gene coding for U1 RNA
Cell 23, 671 - 680
5. Weinmann R. & Roeder R.G. (1974)
Role of DNA - dependent RNA polymerase II in the transcription of the tRNA and rRNA genes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1790 - 1794
6. McKnight S.L. & Kingsbury R. (1982)
Transcriptional control signals of a eucaryotic protein coding gene
Science 217, 316 - 324
7. Brown D.D. (1981)
Gene expression in eucaryotes
Science 217, 667 - 674
8. Derman E., Krauter K., Walling L., Weinberger C., Ray M. & Darnell J.E.Jr. (1981)
Transcriptional control in the production of liver specific mRNAs
Cell 23, 731 - 739
9. Darnell J.E.Jr. (1982)
Variety in the level of gene control in eucaryotic cells
Nature 297, 365 - 371
10. Schibler U. & Perry R.P. (1977)
The 5' - termini of hnRNA: a comparison among molecules of different sizes and ages
Nucl. Acids Res. 4, 4133 - 4150
11. Shatkin A.J. (1976)
Capping of eucaryotic mRNAs
Cell 9, 645 - 653
12. Busch H., Hirsch F., Gupta H.K., Rao M., Spohn W., & Wu B.C. (1976)
Structural and functional studies on 5'-cap: a survey method for mRNA
Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 19, 30 - 61
13. Perry R.P. & Kelly D.E. (1976)
Kinetics of formation of 5' - terminal caps in mRNA
Cell 8, 433 - 442
14. Proudfoot N.J. (1984)
The end of the message and beyond
Nature 307, 412 - 413

15. Proudfoot N.J. & Brownlee G.G. (1976)
3' - noncoding region sequences in eucaryotic mRNA
Nature 263, 211 - 214
16. Salditt - Georgiev M., Jelinek W., Darnell J.E., Furuichi Y.,
Morgan M. & Shatkin A. (1976)
Methyl labeling of HeLa cell hnRNA: a comparison with mRNA
Cell 7, 227 - 238
17. Moss B., Gershowitz A., Weber L.A., Baglioni C. (1977)
Histone mRNAs contain blocked and methylated 5' - terminal
sequences but lack methylated nucleosides at internal positions.
Cell 10, 113 - 120
18. Herman R.C., Williams J.G. & Penman S. (1979)
Message and non - message sequences adjacent to poly(A) in steady
state hnRNA of HeLa cells
Cell 7, 429 - 437
19. Stevenin J., Gattoni R., Divilliers G. & Jacob M. (1979)
Rearrangements in the course of pre - messenger ribonucleoproteins:
a warning
Eur. J. Biochem. 95, 593 - 606
20. Beyer A.L., Miller O.L.Jr. & McKnight S.L. (1980)
Ribonucleoprotein structure in nascent hnRNA is nonrandom and
structure - dependent
Cell 20, 75 - 84
21. Samarina O.P., Lukanidin E.M., Molnar J. & Georgiev G.P. (1968)
Structural organisation of nuclear complexes containing DNA - like
RNA
J. Mol. Biol. 33, 251 - 263
22. Kulguskin V.V., Krichevskaya A.A., Lukanidin E.M. &
Georgiev G.P. (1980)
Studies on dissociation and reconstitution of nuclear 30 S
ribonucleoprotein particles containing pre - mRNA
Biochim. Biophys. Acta 609, 410 - 424
23. Niessing J. & Sekeris C.E. (1970)
Cleavage of high molecular weight DNA - like RNA by a nuclease
present in 30 S ribonucleoprotein particles of rat liver nuclei
Biochim. Biophys. Acta 209, 484 - 492
24. Pederson T. (1974)
Proteins associated with hnRNA in eucaryotic cells
J. Mol. Biol. 83, 163 - 183
25. Beyer A.L., Christensen M.E., Walker B.W. &
LeStourgeon W.M. (1977)
Identification and characterisation of the packaging proteins of
core 40 S hnRNP - particles
Cell 11, 127 - 138
26. Peters K.E. & Comings D.E. (1980)
Two - dimensional gel electrophoresis of rat liver nuclear washes,
nuclear matrix and hnRNP proteins
J. Cell Biol. 86, 135 - 155

27. Suria D. & Liew C.C. (1979)
Characterisation of proteins associated with nuclear
ribonucleoprotein particles by two - dimensional polyacrylamide gel
electrophoresis
Can. J. Biochem. 57, 32 - 42
28. Brunel C. & Lelay M.N. (1979)
Two - dimensional analysis of proteins associated with
heterogeneous nuclear RNA in various animal cell lines
Eur. J. Biochem. 99, 273 - 283
29. Billings P.B. & Martin T.E. (1978)
Proteins of nuclear ribonucleoprotein complexes
Methods Cell Biol 17, 349 - 376
30. LeStourgeon W.M., Beyer A.L., Christensen M.E., Walker B.W.,
Poupore S.M. & Daniels L.P. (1978)
The packaging proteins of core hnRNP particles and the maintenance
of proliferative cell states
In "Cold Spring Harbor Symposium on quantitative Biology",
Vol. XLII, 885 - 898
Cold Spring Harbor Laboratory
31. Martin T., Jones R. & Billings P. (1979)
HnRNP core proteins: synthesis, turnover and intracellular
distribution
Mol. Biol. Rep. 5, 37 - 42
32. Lerner M.R., Boyle J.A., Mount S.M., Wolin S.L. &
Steitz J.A. (1980)
Are snRNAs involved in splicing?
Nature 283, 220 - 224
33. Busch H., Reddy R., Henning D., & Epstein P. (1980/81)
Structure of the U - snRNAs
In "International Cell Biology", pp. 47 - 52
(ed.: H.G. Schweiger) Springer - Verlag, Berlin
34. Zieve G. & Penman S. (1976)
Small snRNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular
localisation
Cell 8, 19 - 31
35. Busch H., Reddy R., Rothblum L. & Choi Y.C. (1982)
SnRNAs, snRNPs and RNA - processing
Ann. Rev. Biochem. 51, 616 - 654
36. Rogers J. & Wall R. (1980)
A mechanism for RNA - splicing
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1877 - 1879
37. Breathnach R. & Chambon P. (1981)
Organisation and expression of eucaryotic split genes coding for
proteins
Ann. Rev. Biochem. 50, 349 - 382
38. Lerner M.R. & Steitz J.A. (1979)
Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are
produced by patients with systemic lupus erythematosus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5495 - 5499

39. Zieve G. & Penman S. (1981)
Subnuclear particles containing a small nuclear RNA and heterogeneous nuclear RNA
J. Mol. Biol. 145, 501 - 523
40. Bringmann P., Rinke J., Appel B., Reuter R. & Lührmann R. (1983)
Purification of snRNPs U1, U2, U4, U5 and U6 with 2,2,7 - trimethylguanosine - specific antibody and definition of their constituent proteins reacting with anti - Sm and anti - U1 RNP antisera
EMBO - Journal 2, 1129 - 1135
41. Herman R. & Penman S. (1977)
Multiple decay rates of hnRNA in HeLa cells
Biochemistry 16, 3460 - 3464
42. Gruss P., Lai C.-J., Dhar R. & Khoury G. (1979)
Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16 S mRNA of Simian Virus 40
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4317 - 4321
43. Paine P.L. & Horowitz S.R. (1980)
The movement of material between nucleus and cytoplasm
In "Cell Biology: A Comprehensive Treatise", Vol. 4, pp.299 - 338
(eds.: D.M. Prescott, L. Goldstein), Acad. Press, N.Y.
44. Wand J.R., Podalsky D.K. & Isselbacher K.J. (1976)
Mechanism of human lymphocyte stimulation by Concanavalin A: Role of valence and surface binding sites
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2118 - 2122
45. Cooper H.L. (1973)
Effects of mitogens on the mitotic cycle: a biochemical evaluation of lymphocyte activation
In "Drugs and the cell cycle", pp 137 - 194
Acad. Press N.Y.
46. Schäfer K.P., Gabaldon de Koch I., Wilk H.-E. & Kecskemethy N. (1983)
Post - transcriptional RNA processing and the activation of lymphocytes
In "Intercellular Communication in leucocyte function", pp.395-403
(eds.: J.W. Parker, O'Brien R.L.), John Wiley & Sons Ltd., N.Y.
47. Peters J.H. (1975)
Preparation of large quantities of pure bovine lymphocytes and a monolayer technique for lymphocyte cultivation
Meth. Cell Biol. 9, 1 - 11
48. Penman S. (1966)
RNA metabolism in the HeLa cell nucleus
J. Mol. Biol. 17, 117 - 130
49. Wilk H.-E., Kecskemethy N. & Schäfer K.P. (1982)
m-Aminophenylboronate agarose specifically binds capped snRNAs and mRNAs
Nucl. Acids Res. 10, 7621 - 7633
50. Laemmli U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680 - 685

51. O'Farrel P.Z., Goodman H.W. & O'Farrel P.H. (1977)
High - resolution two - dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins
Cell 12, 1133 - 1142
52. Hunkapiller M.W., Lujan E., Ostrander F. & Hood L.E. (1983)
Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for aminoacid analysis
Meth. in Enzymology 91, 227 - 236
53. Elder J.H., Pickett R.A.II., Hampton J. & Lerner R.A. (1977)
Radioiodination of proteins in single polyacrylamide gel slices
J. Biol. Chem. 252, 6510 - 6515
54. Greenwood F.C., Hunter W.H. & Glover J.S. (1963)
The preparation of ^{131}I - labeled human growth hormone of high specific radioactivity
Biochem. J. 89, 114 - 123
55. Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W. & Laemmli U.K. (1977)
Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis
J. Biol. Chem. 252, 1102 - 1106
56. Desrosiers R.D., Friderici K.H. & Rottman F.M. (1974)
Identification of methylated nucleosides in mRNA from Novikoff Hepatoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3971 - 3975
57. Aviv H. & Leder P. (1972)
Purification of biologically active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408 - 1412
58. Benson J.V.Jr., Gordon M.J. & Patterson J.A. (1967)
Accelerated chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids containing glutamate and asparagin
Anal. Biochem. 18, 228 - 240
59. Berger S.L. & Birkenmeier C.S. (1979)
Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside - vanadyl complexes: Isolation of mRNA from resting lymphocytes
Biochemistry 18, 5143 - 5149
60. Laskey R.A. & Mills A.D. (1975)
Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography
Eur. J. Biochem. 56, 335 - 341
61. Bradford M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding
Anal. Biochem. 72, 248 - 254
62. Thomas P.S. (1980)
Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201 - 5205

63. Samarina D.P., Krichevskaya A.A. & Georgiev G.P. (1966)
Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger
ribonucleic acid
Nature 210, 1319 - 1322
64. Stevenin J. & Jacob M. (1974)
Effects of sodium chloride and pancreatic ribonuclease on the rat -
brain nuclear particles: The fate of the protein moiety
Eur. J. Biochem. 47, 129 - 137
65. Karn J., Vidali G., Boffa L.C. & Allfrey K.G. (1977)
Characterisation of the non - histone nuclear proteins associated
with rapidly labeled heterogeneous nuclear RNA
J. Biol. Chem. 252, 7307 - 7322
66. Zucker - Franklin D. (1969)
The ultrastructure of lymphocytes
Seminars in Hematology 6, 4 - 27
67. Gabaldon de Koch I. (1983)
Untersuchungen an nucleären RNP - Komplexen aus Rinderlymphocyten
Dissertation - Ruhr Universität Bochum
68. Gabaldon de Koch I., Wilk H.-E. & Schäfer K.P. (1981)
ConA - stimulated bovine lymphocytes: A model to study protein and
RNA components of nuclear ribonucleoprotein particles
In "Mechanisms of Lymphocytes Activation", pp. 222 - 225
(ed.: K. Resch & H. Kirchner), Elsevier/North-Holland Biomedical
Press
69. Song M.-K.H. & Adolph K.W. (1983)
ADP - ribosylation of non - histone proteins during the HeLa cell
cycle
Biochem. Biophys. Res. Comm. 115, 938 - 945
70. Blanchard J.M., Ducamp C. & Jeanteur P. (1975)
Endogeneous protein kinase activity in nuclear RNP - particles from
HeLa cells
Nature 253, 467 - 468
71. McGhee J.D. & Felsenfeld G. (1980)
Nucleosome structure
Ann. Rev. Biochem. 49, 1115 - 1156
72. Isenberg E. (1979)
Histones
Ann. Rev. Biochem. 48, 159 - 191
73. Phan Dinh Tuy F., Henry J., Rosenfeld C. & Kahn A. (1983)
High tyrosine kinase activity in normal non - proliferating cells
Nature 305, 435 - 438
74. Gabaldon de Koch I., Wilk H.-E., Friedrich D.D. &
Schäfer K.P. (1985)
Nuclear ribonucleoprotein complexes in lymphocytes: Effects on
protein and RNA components after lectin addition
J. Biol. Chem. zur Publikation eingereicht
75. Sealy L. & Chalkley R. (1978)
The effect of sodium butyrate on histone modification
Cell 14, 115 - 121

76. Joseph G., Caizergues-Ferrer M. & Amalric F. (1983)
Histones from chinese hamster ovary cells
Eur. J. Biochem. 135, 143 - 149
77. Martin T.E. & Okamura C.S. (1981)
hnRNP protein distribution in various differentiated vertebrate cells
In "International Cell Biology", pp. 77 - 84
(ed.: H.G. Schweiger), Springer Verlag, Berlin
78. Leser G.P., Escara-Wilke J. & Martin T.E. (1984)
Monoclonal antibodies to heterogeneous nuclear RNA - protein complexes
J. Biol. Chem. 259, 1827 - 1833
79. van Venrooij W.J. (1984)
persönliche Mitteilung
80. Paik W.K. & Kim S. (1979)
Protein Methylation
(ed.: A. Meister), John Wiley & Sons, N.Y.
81. Chothia C. (1973)
Conformation of twisted β - pleated sheets in proteins
J. Mol. Biol. 75, 295 - 302
82. Carter C.W.Jr. & Kraut J. (1974)
A proposed model for interaction of polypeptides with RNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 283 - 287
83. Jukes T.H., Holmquist R. & Moise H. (1975)
Amino acid composition of proteins: Selection against the genetic code
Science 189, 50 - 51
84. Boffa L.C., Karn J., Vidali G. & Allfrey V.G. (1977)
Distribution of N^G, N^G -dimethylarginine in nuclear protein fraction
Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 969 - 976
85. Christensen M.E., Beyer A.L., Walker B. & LeStourgeon W.M. (1977)
Identification of N^G, N^G -dimethylarginine in a nuclear protein from the lower eucaryote *Physarum Polycephalum* homologous to the major proteins of mammalian 40 S RNP - particles
Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 621 - 629
86. Lee H.W., Kim S. & Paik W.K. (1977)
S - Adenosylmethionine - protein - arginine methyltransferase: Purification and mechanism of the enzyme
Biochemistry 16, 78 - 85
87. Lee H.W. & Paik W.K. (1972)
Histone methylation during hepatic regeneration in rats
Biochim. Biophys. Acta 227, 107 - 116
88. Lee H.W., Paik W.K. & Borun T.W. (1973)
The periodic synthesis of S - adenosylmethionine protein methyltransferases during the HeLa S3 cell cycle
J. Biol. Chem. 248, 4194 - 4199
89. Metzger H., Shapiro M.B., Mosiman J.E. & Vinton J.E. (1968)
Assessment of compositional relatedness between proteins
Nature 219, 1166 - 1168

90. Slobin L.I. (1970)
Possible structural homologies among 30 S ribosomal proteins
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 470 - 478
91. Cornish-Bowden A. (1983)
Relating proteins by amino acid composition
Meth. in Enzymology 91, 60 - 75
92. Fiers W., Contreras R., Duerinck F., Haegeman G., Iserentant D., Merregaert D., Min Jau W., Molemans F., Raeymaekers A., Van den Berghe A., Volckaert G. & Ysebaert M. (1976)
Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS 2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene
Nature 260, 500 - 507
93. Calvet J.P. & Pederson T. (1978)
Nucleoprotein organisation of inverted repeat DNA transcripts in heterogeneous nuclear RNA - ribonucleoprotein particles from HeLa cells
J. Mol. Biol. 122, 361 - 378
94. Georgiev G.P. & Samarina O.P. (1971)
D-RNA containing ribonucleoprotein particles
In "Advances in Cell Biology", Vol. 2, pp. 47 - 110
(eds.: D.M. Prescott et al.), Meredith, N.Y.
95. Anfinsen C.B., Cuatrecasas P. & Taniuchi H. (1971)
Staphylococcal nuclease, chemical properties and catalysis
In "The Enzymes", Vol.VI, pp. 177 - 204
(ed.: P.D. Boyer), Academic Press, N.Y.
96. Pullman J.M. & Martin T.E. (1983)
Reconstitution of nucleoprotein complexes with mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) core proteins
J. Cell Biol. 97, 99 - 111
97. Pfuderer P., Cammarano P., Holladay D.R. & Novelli G.D. (1965)
A helical polysome model
Biochim. Biophys. Acta 109, 595 - 606
98. a) Hauser H, Knippers R. & Schäfer K.P. (1978)
Increased rate of polyadenylation
Exp. Cell Res. 111, 175 - 184
98. b) Land H. & Schäfer K.P. (1977)
In vitro synthesis and stability of RNA in isolated nuclei from bovine lymphocytes
Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 947 - 957
99. van Eekelen C.A.G. & van Venrooij W.J. (1981)
hnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix
J. Cell Biol. 88, 554 - 563
100. Möller K. & Brimacombe R. (1975)
Specific crosslinking of proteins S7 and L4 to ribosomal RNA by UV - irradiation of *Escherichia Coli* ribosomal subunits
Mol. Gen. Genetics 141, 343 - 355
101. Economidis I.V. & Pederson T. (1983)
Structure of nuclear ribonucleoprotein: hnRNA is complexed with a major sextet of proteins in vivo
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1599 - 1602

102. van Eekelen C.A.G., Mariman E.C.M., Reinders R.J. & van Venrooij W.J. (1981)
Adenoviral heterogeneous nuclear RNA ist associated with host cell proteins
Eur. J. Biochem. 119, 461 - 467
103. Economidis I.V. & Pederson T. (1982)
Assembly of nuclear ribonucleoprotein particles during *in vitro* transcription
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1469 - 1473
104. Werr H. (1984)
Untersuchungen an den hnRNP - Proteinen der A- und C-Gruppe aus HeLa Zellen
Diplomarbeit, Ruhr - Universität Bochum
105. Ohshima Y., Itoh M. & Miyaha T. (1981)
Novel models for RNA splicing that involve a small nuclear RNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4471 - 4474
106. Padgett R.A., Mount S.M., Steitz J.A. & Sharp P.A. (1983)
Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein
Cell 35, 101 - 107
107. Boak A.M., Kincaid L.A., Treadwell E.L., McDonald P., Ellis K.R., Sharp G.C. & Agris P.F. (1984)
Comparison of various preparations of nuclear antigens by hemagglutination inhibition (HAI)
Immun. Commun. 13, 127 - 131
108. Stuhrmann H.B. (1979)
Neutronenstreuung an Biopolymeren
Chemie in unserer Zeit 13, 11 - 22
109. Hjelm R.P., Kneale G.G., Suau P., Baldwin J.P., Bradbury E.M. & Ibel K. (1977)
Small angle neutron scattering studies of chromatin subunits in solution
Cell 10, 139 - 151
110. Bacon G.E. (1975)
Neutron Diffraction, 3rd ed.
(ed.: W. Jackson et al), Oxford, University Press, London
111. Koch M.H.J. & Stuhrmann H.B. (1979)
Neutron scattering studies of ribosomes
Meth. Enzymology 59, 670 - 706
112. Guinier A. & Fournet G. (1955)
Small angle scattering of X-rays
Wiley and Sons, N.Y.
113. Zaccai G. (1978)
Application of neutron diffraction to biological problems
In "Topics in Current Physics", Vol. 6, pp. 243 - 270
(ed.: H. Dachs), Springer Verlag, Berlin
114. Jacrot B. & Zaccai G. (1981)
Determination of molecular weight by neutron scattering
Biopolymers 20, 2413 - 2426

115. Glatte D. (1977)
A new method for the evaluation of small angle scattering data
J. Appl. Cryst. 10, 415 - 421
116. Müller K. & Glatte D. (1982)
Practical aspects of the use of indirect Fourier transformation methods
Makromol. Chem. 183, 465 - 479
117. Guinier A. (1968)
Small angle scattering
In "International Tables of X-Ray Crystallography", Vol. III, pp. 324 - 329
(ed.: K. Lonsdale et al), Kynoch, Birmingham
118. Holoubek V. (1983)
Nuclear ribonucleoproteins containing heterogeneous RNA
In "Chromosomal Nonhistone Proteins - Biochemistry and Biology", Vol. 4
(ed.: V. Hnilica), CRC Press Inc., Boca Raton
119. Georgiev G.P., Samarina O.P., Lerman M.I., Smirnov M.N. & Severtzov A.N. (1983)
Biosynthesis of messenger and ribosomal ribonucleic acids in the nucleolo - chromosomal apparatus of animal cells
Nature 200, 1291 - 1294
120. Soeira R., Vaughan M.H., Warner J.R. & Darnell J.E. (1968)
The turnover of nuclear DNA - like RNA in HeLa cells
J. Cell Biol. 39, 112 - 118
121. Chow L.T., Gelinas R.E., Broker T.R. & Roberts R.J. (1977)
An amazing sequence arrangement at the 5'-ends of Adenovirus 2 messenger RNA
Cell 12, 1 - 8
122. Tiemeier D.C., Tilghman S.M., Polsky F.J., Seidman J.G., Leder A., Edgell M.H. & Leder P. (1978)
A comparison of two cloned mouse β -globin genes and their surrounding and intervening sequences
Cell 14, 237 - 245
123. Garapin A.C., Cami B., Roskam W., Kouritsky P., LePennec J.P., Perrin F., Gerlinger P., Cochet M. & Chambon P. (1978)
Electron microscopy and restriction enzyme mapping reveal additional intervening sequences in the chicken ovalbumin split gene
Cell 14, 629 - 639
124. LeStourgeon W.M., Lothstein L., Walker B.W. & Beyer A.L. (1981)
The composition and general topology of RNA and protein in monomer 40S ribonucleoprotein particles
In "The cell nucleus", Vol. IX, pp. 49 - 87
(ed.: H. Busch), Academic Press, N.Y.
125. Seeman N.E., Rosenberg J.M. & Rich A. (1976)
Sequence specific recognition of double helical nucleic acids by proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 804 - 808

126. Mansy S., Engstrom S.K. & Peticolas W.L. (1976)
Laser raman identification of an interaction site on DNA for arginine containing histones in chromatin
Biochem. Biophys. Res. Comm. 68, 1242 - 1247
127. Yang K.W., Lerner M.R., Steitz J.A. & Flint S.J. (1981)
A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences
Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 1371 - 1375
128. Mount S.M., Petterson I., Hinterberger M., Karmas A & Steitz J.A. (1983)
The U1 small nuclear RNA - Protein complex selectively binds a 5'-splice site *in vitro*
Cell 33, 509 - 518
129. Will H., Lakomek H.-J. & Bautz E.K.F. (1981)
Reaction of human autoantibodies with antigens of polytene chromosomes of *Drosophila*
Exp. Cell Res. 134, 129 - 140
130. Kruger K., Gabrowski P.J., Zaig A.J., Sands J., Gottschlieng D.E. & Cech T.R. (1982)
Self - splicing RNA: Autoexcision and autocyclisation of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*
Cell 31, 147 - 157
131. Bass B.L. & Cech T.R. (1984)
Specific interaction between self - splicing RNA of *Tetrahymena* and its guanosine substrate: implication for biological catalysis by RNA
Nature 308, 820 - 826
132. Lazowska J., Jacq C. & Slonimski P.P. (1980)
Sequence of introns and flanking exons in wildtype and box 3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron
Cell 22, 333 - 348
133. Peebles C.L., Gegenheimer P. & Abelson J. (1983)
Precise excision of intervening sequences from precursor tRNAs by a membrane associated yeast endonuclease
Cell 32, 525 - 536
134. Greer C.L., Peebles C.L., Gegenheimer P. & Abelson J. (1983)
Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing
Cell 32, 537 - 546
135. Reed R.E., Baer M.F., Guerrier - Takada G., Donis - Keller H. & Altman S. (1982)
Nucleotide sequence of the gene encoding the RNA subunit (M1 RNA) of ribonuclease P from *Escherichia coli*
Cell 30, 627 - 636
136. Guerrier - Takada G., Gardiner K., Marsh T., Pace N. & Altman S. (1983)
The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme
Cell 35, 849 - 857

137. Church G.M., Slonimski P.P. & Gilbert W. (1979)
Pleiotropic mutations within two yeast mitochondrial cytochrome genes block mRNA processing
Cell 18, 1209 - 1215
138. Heide B. & Benecke B.J. (1981)
The association of small nuclear RNA species with rapidly sedimenting subnuclear structures
In "International Cell Biology", pp. 53 - 59
(ed.: H.G. Schweiger), Springer Verlag, Berlin
139. Chamberlin M.J. (1976)
Interaction of RNA - polymerase with the DNA template
In "RNA Polymerase", pp. 159 - 191
(eds.: R. Losick, M.J. Chamberlin), Cold Spring Harbor Laboratory, CSH
140. Galli G., Hofstetter H., Stunnenberg H.G. & Birnstiel M.L. (1983)
Biochemical complementation with RNA in the *Xenopus* oocyte: A small RNA is required for the generation of 3'-histone mRNA termini
Cell 34, 823 - 828
141. Krieg P.A. & Melton D.A. (1984)
Formation of the 3'-end of histone mRNA by posttranscriptional processing
Nature 308, 203 - 206
142. Berget S.M. (1984)
Are U4 small nuclear ribonucleoproteins involved in polyadenylation?
Nature 309, 179 - 182
143. Hashimoto C. & Steitz J.A. (1984)
U4 and U6 RNAs coexist in a single small nuclear ribonucleoprotein particle
Nucl. Acid. Res. 12, 3283 - 3293
144. Prestayko A.W., Tonato M. & Busch H. (1970)
Low molecular weight RNA associated with 28S nucleolar RNA
J. Mol. Biol. 47, 505 - 515
145. Brown R.S., Hingerty B.E., Dewan J.C. & Klug A. (1983)
Pb(II)-catalyzed cleavage of the sugar - phosphate backbone of yeast tRNA^{Phe} - implications for lead toxicity and self - splicing RNA
Nature 303, 543 - 546
146. Gross H.J. & Riesner D. (1980)
Viroide: Eine Klasse subviraler Krankheitserreger
Angew. Chem. 92, 233 - 245
147. Sanger H.L., Ramin K., Domdey H., Gross H.J., Henco K. & Riesner D. (1979)
Conversion of circular viroid molecules to linear strands
FEBS - Lett. 99, 117 - 122
148. McCumber M. & Ornstein R.L. (1984)
Molecular model for messenger RNA splicing
Science 224, 402 - 405

149. Tyc K., Kikuchi Y., Konarska M., Filipowicz W. & Gross H.J. (1983)
Ligation of endogeneous tRNA 3'-half molecules to their corresponding 5'-halves via 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester bonds in extracts of *Chlamydomonas*
EMBO J. 2, 605 - 610
150. Filipowicz W. & Shatkin A.J. (1983)
Origin of splice junction phosphate in tRNAs processed by HeLa cells extracts
Cell 32, 547 - 557
151. Wallace J.C. & Edmonds M. (1983)
Polyadenylated nuclear hnRNA contains branches
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 950 - 954
152. Hardy S.J.S., Kurland C.G., Voynow P. & Mora B. (1969)
The ribosomal proteins of *Escherichia coli* I. Purification of the 30S ribosomal proteins
Biochemistry 8, 2897 - 2905
153. Mayrand S. & Pederson T. (1983)
Heat shock alters nuclear ribonucleoprotein assembly in *Drosophila* cells
Mol. Cell. Biol. 3, 161 - 171
154. Pederson T. (1983)
Nuclear RNA - protein interactions and messenger RNA processing
J. Cell Biol. 97, 1321 - 1326
155. vanEekelen C., Ohlsson R., Philipson L., Mariman E., van Beek R. & van Venrooij W. (1982)
Sequence dependent interaction of hnRNP proteins with late adenoviral transcripts
Nucl. Acid. Res. 10, 7115 - 7131
156. Ciejek E.M., Nordstrom J.L., Tsai M.-J. & O'Malley B.W. (1982)
Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix
Biochemistry 21, 4945 - 4953
157. Hernandez N. & Keller W. (1983)
Splicing of *in vitro* synthesized messenger RNA precursors in HeLa cell extracts
Cell 35, 89 - 99
158. Grabowski P.J., Padgett R.A. & Sharp P.A. (1984)
Messenger RNA splicing *in vitro*: An excised intervening sequence and a potential intermediate
Cell 37, 415 - 427
159. Reiter T. & Penman S. (1983)
"Prompt" heat shock proteins: Translationally regulated synthesis of new proteins associated with the nuclear matrix - intermediate filaments as an early response to heat shock
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4737 - 4741
160. Ross D.A., Yen R.-W. & Chae C.-B. (1982)
Association of globin RNA and its precursors with the chicken erythroblast nuclear matrix
Biochemistry 21, 764 - 771

161. Marvil D.K., Nowak L. & Szer W. (1980)
A single stranded nucleic acid binding protein from *Artemia salina*
J. Biol. Chem. 255, 6466 - 6472
162. Thomas J.O., Raziuddin, Sobota A., Boublik M. & Szer W. (1981)
A helix destabilizing protein is a major component of *Artemia salina* nuclear ribonucleoproteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2888 - 2892

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Hans-Erich Alexander Wilk
Geburtstag und -ort: 16.11.1956 in Gelsenkirchen-Buer
Wohnort: Provinzialstr. 194
4600 Dortmund 72
Eltern: Alexandra Wilk, geb. Hannemann,
geb. 26.10.1933, Altenpflegerin
Herbert Wilk, geb. 26.8.1929
gest. 5.6.1976, Chemiefacharbeiter

Schulausbildung:

Grundschule: Ostern 1963 - Juli 1965
Wichernschule Gelsenkirchen-Buer
August 1965 - November 1966
Volksschule Dorsten-Altendorf
Gymnasium: Dezember 1966 - Juni 1975
Leibniz-Gymnasium Gelsenkirchen-Buer
2. Juni 1975
Abitur des mathematisch - naturwissen-
schaftlichen Zweiges des Leibniz -
Gymnasiums

Wehrdienst:

1. Juli 1975 - 30. September 1976
Grundwehrdienst

Studium:

seit WS 1976/77 immatrikuliert an der Ruhr-Universität
Bochum für den Studiengang Chemie
(Diplom)
6. Oktober 1978 Vordiplom
2. November 1981 Diplom im Fach Chemie/Biochemie
16. Dezember 1982 "Preis der Ruhr-Universität Bochum
für Dissertationen und Diplomarbeiten
1982" für Diplomarbeit
seit 1. 12. 1981 Promotion am Lehrstuhl für Biochemie
der Ruhr - Universität Bochum bei
Herrn Prof. Dr. Schäfer

Publikationsliste

1. Gabaldon de Koch I., Wilk H.-E. & Schäfer K.P. (1981)
ConA - stimulated bovine Lymphocytes: A model to study protein and RNA components of nuclear ribonucleoprotein particles
In "Mechanisms of Lymphocyte Activation", pp. 222-225
(eds.: K. Resch & H.Kirchner), Wiley & Sons, N.Y.
2. Wilk H.-E., Kecskemethy N. & Schäfer K.P. (1982)
m - Aminophenylboronate agarose specifically binds capped snRNAs and mRNAs
Nucl. Acid. Res. 10, 7621 - 7633
3. Schäfer K.P., Gabaldon de Koch I., Wilk H.-E. & Kecskemethy N. (1983)
Post - transcriptional RNA processing and the activation of lymphocytes
In " Intercellular Communication in Leucocyte Function", pp. 395-403
(eds.: J.W. Parker & R.L. O'Brien), Wiley & Sons, N.Y.
4. Wilk H.-E., Angeli G. & Schäfer K.P. (1983)
In vitro reconstitution of 35S ribonucleoprotein complexes
Biochemistry 22, 4592 - 4600
5. Wilk H.-E., Friedrich D.D., Werr H., Kiltz H.H. & Schäfer K.P. (1984)
The core proteins of 35S complexes: Characterisation of nine different species
Eur. J. Biochem., *in Druck*
6. Wilk H.-E., Boak A.M., Agris P.F. & Schäfer K.P. (1984)
Initial association of snRNP U1 and hnRNP complexes requires snRNP - proteins but not hnRNA introns
Nucl. Acid. Res., *zur Publikation eingereicht*

7. Gabaldon de Koch I., Wilk H.-E., Friedrich D.D. & Schäfer K.P. (1985)

Nuclear ribonucleoprotein complexes in lymphocytes:
Effects on protein and RNA components after lectin
addition

J. Biol. Chem., *zur Publikation eingereicht*

8. Wilk H.-E., May R. & Schäfer K.P. (1985)

Neutron small angle scattering on 35S RNP particles

J. Mol. Biol., *in Vorbereitung*

